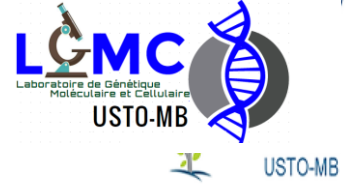




الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة وهران للعلوم والتكنولوجيا "محمد بوضياف"
كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الوراثة الجزيئية التطبيقية



People's Democratic Republic Of Algeria
Ministry of Higher Education and Scientific Research
University of Science and Technology of Oran Mohamed BOUDIAF
Faculty of Natural and Life Sciences
Department of Applied Molecular Genetics

Polycopié de cours

Génétique Humaine

Cours destiné aux étudiants de troisième année Licence Génétique

Elaboré par :

Dr. BOUSHABA Nadjet

Maître de Conférences classe "B"

Année universitaire : 2022-2023

Avant-propos

Les cours permettent d'accéder à du contenu sur les objectifs d'apprentissage et permet aux étudiants de mettre en pratique leurs connaissances. Les objectifs d'apprentissage permettent de déterminer les connaissances à acquérir et les compétences à développer par les étudiants au terme d'une activité d'apprentissage. Ce polycopié a été conçu comme support pédagogique de la matière de Génétique Humaine destiné aux étudiants de la troisième année, semestre 6, spécialité "Génétique", année universitaire 2022-2023 suivant le canevas ministériel en complément des notions générales de Génétique formelle et Biologie Moléculaire et Cytogénétique déjà acquises par les étudiants en deuxième année de Licence en Biologie. Le contenu porte sur la transmission des maladies héréditaires et sur la manière dont une version d'un gène défectueux (ou plusieurs) est (sont) à l'origine d'une pathologie spécifique.

Le cours vise à approfondir les connaissances de l'étudiant en médecine génétique. L'objectif est de comprendre la variabilité du génome humain, ses divers polymorphismes, et leurs fréquences et évolution, ainsi que l'importance des variations génétiques dans la variation phénotypique. Le cours comporte six grandes parties: (i) l'ADN (ii) les principes de caryotype normal et anormal (iii) transmission des caractères héréditaires (iv) les différents types de polymorphismes et leurs utilités dans les analyses génétiques (v) méthodes de détection des marqueurs génétiques et (vi) les technologies basiques en Biologie moléculaire (PCR). L'objectif de ce polycopié de cours est l'apport de la génétique humaine à la compréhension des maladies communes. A l'issue de cette matière, les étudiants auront une connaissance permettant de fournir les bases scientifiques permettant de : se représenter de façon intégrée les différents niveaux d'organisation du vivant (gène, molécule, cellule, organe, organisme, population,...).

Cet enseignement permettra aux étudiants d'avoir une vue d'ensemble et de mieux comprendre les enseignements plus spécialisés notamment l'application des notions de base en génétique dans l'examen clinique (histoire familiale) des patients, d'interpréter les résultats d'une analyse de liaison dans le contexte familial de ces patients et d'interpréter les données des analyses d'association dans les publications médicales.

Résumé

La compréhension de l'hérédité a considérablement progressé ces 20 dernières années. L'étude des maladies monogéniques a fortement contribué à nous éclairer sur le fonctionnement des gènes et le récent décryptage du génome humain sur son organisation. Les connaissances ont évolué et modifié notre vision de l'hérédité : à l'heure actuelle, les lois de Mendel appliquées aux maladies monogéniques ne suffisent plus à expliquer la transmission de nos caractères. Les régulations du génome et ses interactions, y compris l'impact de l'environnement, démontrent la complexité de la transmission de nos traits et les modulations précises à la fois acquises et héréditaires qui en résultent pour chaque individu.

La génétique humaine, branche de la génétique, étudie la transmission des caractères héréditaires chez l'Homme au cours des générations. Devant les difficultés qui entravent cette étude, les chercheurs se sont penchés, surtout, sur l'étude des modalités de la transmission des maladies et malformations héréditaires, pour accumuler des connaissances sur les gènes qui en sont responsables.

Les méthodes d'enseignement sont également influencées par les théories de l'apprentissage, qui cherchent à comprendre comment les apprenants acquièrent des connaissances et des compétences. Les enseignants peuvent utiliser ces théories pour adapter leur méthode d'enseignement en fonction des besoins et des préférences des apprenants. L'enseignement direct est une méthode d'enseignement dirigée par l'enseignant. En d'autres termes, l'enseignant se tient devant une salle de classe et présente les informations. L'enseignant prépare le terrain pour l'apprentissage. C'est l'accroche du cours. Il vise à impliquer les étudiants, à attirer leur attention et à activer leurs connaissances antérieures. Le but de ce polycopié est l'élaboration conceptuelle d'un cours de Génétique Humaine. Ce polycopié parcourt les modes de transmission mendélienne des maladies héréditaires, les méthodes de biologie moléculaire, le conseil génétique aux maladies multifactorielles, les stratégies du diagnostic génotypique. Le polycopié se termine par des références bibliographiques.

Mots clés : Biologie Moléculaire - Conseil génétique - Gènes - Génétique Humaine - Maladies héréditaires.

Abréviations

ADN	Acide D ésoxyribo N ucléique
ADNe	Acide D ésoxyribo N ucléique C omplémentaire
ADNmt	Acide D ésoxyribo N ucléique mitochondrial
ARN	Acide R ibo N ucléique
CM	C entimorgan
Kb	K ilobase
nt	N ucléotide
pb	P aire de b ases
PCR	<i>"Polymerase Chain Reaction"</i>
PIC	<i>Polymorphic Information Content</i>
RFLP	<i>Restriction Frangment Lenght Polymorphism</i>
Taq	<i>"Termus aquaticus"</i>
VNTR	<i>Variable Numbner Tandem Repeats</i>
°C	D egré C elsius
XIC	<i>X Chromosome Inactivation</i>
XIST	<i>X-Inactive Specific Transcript</i>
TSIX	Antisens à XIST
%	P ourcentage

Liste des tableaux

Tableau 1 : Motifs répétés en tandem dans les microsatellites polymorphes	46
Tableau 2 : Exemples d'oligonucléotides de synthèse allèle-spécifique pour le diagnostic de mutations ponctuelles	49

Liste des figures

Figure 1 : Symboles utilisés dans l'analyse d'arbres généalogiques humains.....	07
Figure 2 : Relation de parenté dans un arbre généalogique	08
Figure 3 : Arbre généalogique d'un phénotype récessif rare déterminé par un allèle récessif a	09
Figure 4 : Arbre généalogique d'un phénotype dominant déterminé par un allèle dominant A	11
Figure 5 : Arbre généalogique montrant des allèles récessifs liés à l' X exprimés chez les hommes	13
Figure 6 : Arbre généalogique d'une maladie dominante liée à l' X	15
Figure 7 : Arbre généalogique montrant l'hérédité d'un caractère lié au chromosome Y . La transmission d'effectue uniquement d'homme à homme	15
Figure 8 : Complémentation : les parents atteints de surdité autosomique récessive profonde ont souvent des enfants dont l'audition est normale	17

Table des matières

Avant-propos	i
Résumé	ii
Abréviations.....	iii
Liste des tableaux	iv
Liste des figures	v
Table des matières	vi
Introduction	01
Chapitre I : Modes classiques de transmission mendélienne	05
I.1 Hérité récessive autosomique	08
I.2 Hérité dominante autosomique	11
I.3 Hérité récessive lié à l'X	12
I.4 Hérité dominante liée à l'X.....	14
I.5 Hérité lié à l'Y	15
Chapitre II. Facteurs qui rendent les profils de transmission mendélienne complexe	17
II.1 Hétérogénéité du locus	17
II.1.1 Action alternative des mutations dans des gènes différents.....	18
II.1.2 Action simultanée de mutations dans différents gènes	19
II.2 Variation allélique et hétérogénéité clinique	19
II.3 Pénétrance.....	20
II.4 Révélation tardive	21
II.5 Expression variable.....	23
II.6 Inactivation de l'X	25
II.7 Mosaïcisme et les chimères	27
II.8 Empreinte génomique et la disomie uniparentale.....	28
Chapitre III. Hérité extrachromosomique ou hérité mitochondriale.....	32
1. Génome mitochondrial et sa pathologie	34
2. Pathologie mitochondriales	34
3. Génétique mitochondriale n'est pas mendélienne	36
Chapitre IV. Diagnostic génotypique	37
IV.1 Définition.....	37
IV.2 Outils du diagnostic génotypique	37
2.1 Southern-blot	37
2.2 Sondes génétiques	39
2.3 PCR	40
2.4 Séquençage	43
Chapitre V. Marqueurs génétiques	46
V.1 RFLP	46
V.2 Minisatellites	48
V.3 Microsatellites	51
Chapitre VI. Stratégies du diagnostic génotypique.....	53
VI.1 Analyse directe	53

VI.2 Analyse indirecte	58
VI.3 Applications du diagnostic génotypique.....	62
Références bibliographiques	64

1. Introduction

Les progrès rapides de la génétique procurent un savoir immédiatement applicable au lit du malade. En effet, les causes génétiques de la maladie ne sont pas rares dans notre société et leur expression est responsable d'une quantité importante de patients puisque chaque spécialité médicale y est confrontée. Qui plus est, il existe aujourd'hui des techniques permettant d'en identifier la cause, et il est possible de tirer profit de cette connaissance pour les éviter ou les prévenir. C'est précisément l'objectif de ce polycopié de présenter aux étudiants les bases et principes de la génétique moderne et de ses applications médicales au sens large.

Le polycopié de la matière Génétique Humaine est organisé en six (06) chapitres :

Le premier chapitre décrit les différents domaines de la génétique et le principe de construire un arbre généalogique. L'objectif de ce cours est d'étudier les modes de transmission mendélienne de tel ou tel caractère de manière à déterminer s'il est récessif ou dominant et s'il est ou non lié au sexe au sein des familles grâce aux arbres généalogiques.

Le deuxième chapitre décrit les facteurs qui rendent le mode de transmission mendélienne complexe, certains font appel à la synergie de gènes et facteurs environnementaux : *i*) l'hétérogénéité phénotypique intra- et inter-familiale pour certaines mutations ; *ii*) la variation allélique et hétérogénéité clinique *iii*) Certains individus possédant le gène délétère (d'une maladie autosomique dominante, par exemple), ne présentent pas le phénotype attendu : on dit alors que la pénétrance est incomplète ; *iv*) la révélation tardive ; *v*) le phénotype peut être plus ou moins sévère selon les individus; il y a alors une expressivité variable du gène délétère ; *vi*) les mécanismes génétiques classiques liés au chromosome X (inactivation du X chez la femme) ; *vii*) le mosaïcisme et les chimères et *viii*) le rôle éventuel de l'empreinte parentale dans la variabilité phénotypique des plusieurs syndromes et la disomie uniparentale.

Le troisième chapitre décrit la transmission des maladies héréditaires mitochondriales qui sont transmises uniquement par la mère. Une organisation générale de la mitochondrie et les caractéristiques de l'ADN mitochondrial (ADNmt) seront détaillées.

Le quatrième chapitre seront décrits les outils du diagnostic génotypique et les différentes interprétations possibles des autoradiogrammes

Le cinquième chapitre décrit les marqueurs génétiques de type RFLP minisatellites et microsatellites (définition, mise en évidence, ségrégation mendélienne et leur exploration).

Le sixième chapitre décrit la stratégie du diagnostic génotypique : analyse directe des maladies monogéniques, l'analyse semi-directe et indirecte sur lesquelles se base le conseil génétique en utilisant des outils de biologie moléculaire et les applications du diagnostic génotypique.

Et enfin, ce polycopié est clôturé par une bibliographie qui englobe les ressources mentionnées dans ce polycopié.

1. Objectifs de l'enseignement

Ce polycopié s'adresse aux étudiants de 3^{ème} année, spécialité "Génétique". Cette matière permet de comprendre les différents modes de transmission d'une maladie ainsi que les différents facteurs qui rendent les modes de transmission complexes. Il permet également d'acquérir des connaissances concernant le diagnostic génotypique des maladies, les outils qui permettent de réaliser cela ainsi que les différentes stratégies concernant ce dernier. Au cours des séances de Travaux Dirigés, de nombreux exercices seront proposés aux étudiants sur les différents points abordés en cours.

2. Compétences acquises

Ces connaissances permettront aux étudiants d'acquérir les compétences théoriques nécessaires pour appréhender les concepts utiles à la pratique expérimentale de Génétique Humaine.

À la fin de ces enseignements l'étudiant devrait être capable de :

- Reconstituer une histoire familiale
- Dessiner un arbre généalogique en utilisant les symboles appropriés
- Comprendre la transmission héréditaire des maladies génétiques monogéniques rencontrée chez l'homme avec leurs critères et donner des exemples de maladies ;
- Nommer les principaux sous-types d'anomalies chromosomiques et donner des exemples de syndrome chez l'homme ;
- Définir l'empreinte parentale et en connaître le mécanisme avec des exemples
- Comprendre les particularités génétiques des maladies mitochondriales. Définir l'effet seuil et les conséquences pathologiques des mutations du génome mitochondrial

- Expliquer les techniques permettant l'identification des gènes responsables de ces maladies
- Décrire les principaux de polymorphismes dans le génome humain et en donner les caractéristiques ;
- Définir et expliquer les marqueurs : RFLP, minisatellites et microsatellites
- Décrire et expliquer les stratégies du diagnostic génotypique des maladies humaines /caractériser des polymorphismes et mutations dans le génome humain
- Expliquer les bases de l'approche de l'analyse d'association ;
- Décrire la loi de Hardy-Weinberg ;
- D'appliquer les notions de base en génétique dans l'examen clinique (histoire familiale) des patients ;
- Le diagnostic génotypique des maladies (analyse direct et indirecte)
- Et enfin, l'application du diagnostic génotypique.

3. Méthodes pédagogiques

3.1 Enseignements en présentiel

La matière comprend deux séances de cours (3h) et une séance de travaux dirigés (1h30) par semaine.

- Les diapositives présentées au cours sont mises à la disposition des étudiants.
- Semestre : 6
- Unité d'Enseignement Fondamentale 2 (UEF 3.2.2) : Génétique Humaine, Cytogénétique et Physiologie
- Matière 1 : Génétique Humaine
- Crédits : 06
- Coefficient : 03
- Support de Cours PowerPoint

Les présentations sont de type Powerpoint avec des phrases courtes, diagrammes, schémas, tableaux, ...) et l'utilisation d'un marqueur sur tableau blanc. L'objectif est de développer l'aptitude à raisonner sur des problèmes de Génétique Humaine et d'apprendre à appliquer les concepts aux données expérimentales. L'étudiant doit prendre des notes lors des explications de l'enseignant et reçoit le cours en PDF.

4. Mode d'évaluation

La note finale de la matière se compose des notes suivantes :

- 60% Examen semestriel écrit comportant une partie QCM et une partie de réponses ouvertes très courtes.

- 40% Contrôles Continus (minimum 02)

- Examen semestriel écrit de type QCM et un exercice

- Durée : 1h30.

Chapitre I.

Modes classiques de transmission mendélienne

Chapitre I. Modes classiques de transmission mendélienne

Les stratégies utilisées pour établir les modes de transmission des caractères chez l'homme diffèrent radicalement des approches de la génétique du pois, de la drosophile, du nématode, du maïs ou de la souris. Les familles humaines sont de petite taille, et le temps de génération est long. On ne peut pas espérer observer des proportions mendéliennes parmi la descendance d'une seule union (croisement). Et il est bien sûr impensable pour des raisons éthiques, morales et pratiques, d'envisager le contrôle des unions dans l'espèce humaine sur le critère des génotypes parentaux (Pasternak, 2003).

1. Définition

Les termes d'hérédité monogénique, d'hérédité monofactorielle ou d'hérédité mendélienne sont employés indifféremment pour caractériser la transmission des maladies génétiques occasionnées par des mutations dans un seul gène.

2. Notions fondamentales

Le noyau des cellules humaines non sexuelles (somatiques) comportent 46 chromosomes (23 paires).

- Les **autosomes** sont les 22 paires de chromosomes identiques dans les deux sexes. Les chromosomes X et Y sont appelés **gonosomes** ou chromosomes sexuels.

- Le **gène** est l'unité d'information génétique. Le site physique où se situe un gène sur le chromosome est dénommé **locus**.

- Les **allèles** sont les différentes formes que peut prendre un même gène, à un locus donné.

- Les allèles diffèrent entre eux par variation de séquence. Certaines de ces variations entraînent un dysfonctionnement du gène : ce sont des **mutations**.

D'autres variations n'ont pas de conséquence sur le fonctionnement du gène : ce sont des **polymorphismes**.

- Un allèle porteur d'une mutation est appelé **allèle morbide** quand la mutation du gène entraîne une maladie.

- Un individu possédant deux allèles identiques à un locus donné est dit **homozygote**.

- Un individu possédant deux allèles différents à un locus est dit **hétérozygote**.

- Le **génotype** décrit, au sens strict, la constitution génétique de la cellule ou de l'individu. Par simplification, ce terme désigne la configuration des allèles à un locus donné.

- Le **phénotype** désigne les caractères observés en génétique humaine. Il peut s'agir aussi bien d'un caractère non pathologique (ex : groupes sanguins, groupes tissulaires HLA) que d'une maladie.

- Une maladie **congénitale** est présente à la naissance ; elle peut être génétique ou non (ex : le virus de la rubéole peut être à l'origine d'anomalies congénitales). A l'inverse, beaucoup de maladies génétiques ne sont pas congénitales et ne s'expriment qu'au cours de la vie ; on estime, en effet, que 10% des maladies monogéniques ne sont découvertes qu'à l'âge adulte (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

3. Dominance et récessivité des allèles

Les notions de dominance et de récessivité sont fondamentales pour comprendre l'hérédité monogénique ; elles définissent les relations entre les deux allèles situés au même locus sur des chromosomes homologues.

- L'allèle *A* est dit **dominant** sur l'allèle *B* si les phénotypes associés au génotype homozygote *AA* et hétérozygote *AB* sont identiques ; l'allèle *B* est dit alors **récessif**.

- Si le phénotype d'un sujet *AB* est intermédiaire entre ceux résultant de *AA* et de *BB*, les allèles *A* et *B* sont dits **semi-dominants**.

- Si le sujet *AB* exprime à la fois ce qui est observé pour le génotype *AA* et pour celui *BB*, les 2 allèles sont dits **co-dominants** (c'est le cas des groupes sanguins *A* et *B*) (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

4. Terminologie

Actuellement, les études familiales représentent une voie de choix de la génétique moléculaire des maladies humaines. On visualise les modes d'hérédité d'un caractère au sein des familles grâce aux arbres généalogiques (les pedigrees). Pedigree est un terme anglais dérivé de l'expression française "pied de grue", qui était la façon imagée par laquelle les français nommaient les lignes d'une représentation généalogique. Un pedigree utilisé dans le cadre d'une analyse génétique comporte un ensemble de symboles pour noter aussi bien les relations interindividuelles que l'histoire d'une caractéristique dans une famille nucléaire ou élargie. Les pedigrees sont les résultats expérimentaux de la génétique humaine (Pasternak, 2003). La construction de l'arbre généalogique utilise les symboles internationaux représentés sur la figure 1.

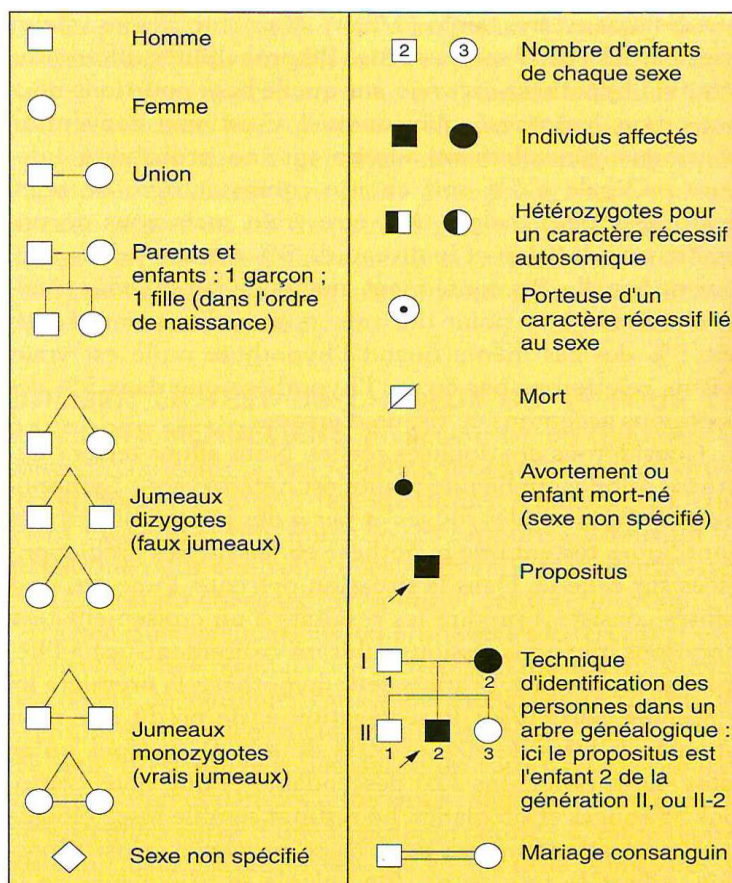


Figure 1 : Symboles utilisés dans l'analyse d'arbres généalogiques humains (Griffiths et al., 2001).

Afin de résoudre le problème du langage, certains termes sont explicités et illustrés dans l'arbre généalogique à la figure 2. Le membre par lequel la présence d'une maladie génétique dans une famille est le **proband** (propositus), et s'il est atteint, il peut également être appelé le **cas index**. L'ensemble des frères et sœurs est appelé **fratrie**. La première génération d'enfants issus d'un mariage constitue la **F1** (première génération filiale). Les germains sont du **premier degré** (parents, frères et sœurs et les enfants du proband), du **deuxième degré** (les grands-parents et les petits enfants, les oncles et les tantes, les neveux et les nièces les demi-frères et les demi-sœurs) et du **troisième degré** (les cousins germains, par exemple). Les couples ayant un ancêtre commun sont dits consanguins. Lorsqu'il n'y a qu'un seul membre atteint dans la famille on dit qu'il existe un cas "**isolé**", et lorsqu'on a pu déterminer que la maladie était due à une *néomutation*, on parle d'un cas "**sporadique**" (Margaret et al., 1995).

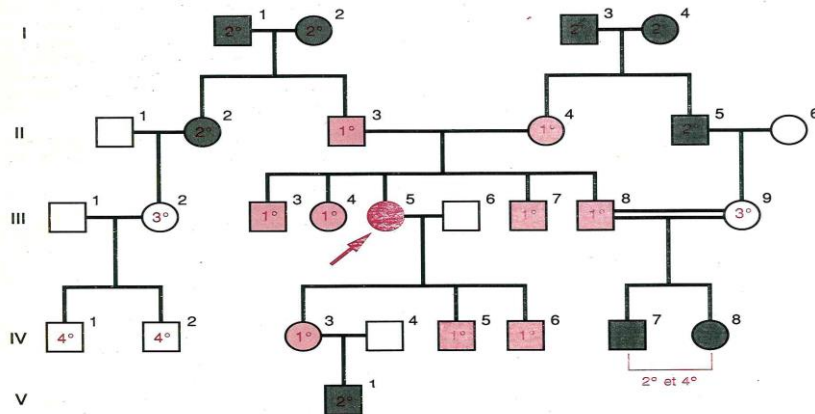


Figure 2 : Relation de parenté dans un arbre généalogique (Margaret et *al.*, 1995).

I.1 Hérité récessive autosomique

Les *loci* d'environ 900 maladies autosomiques récessives différentes sont répartis sur tous les autosomes et concernent de nombreuses fonctions. La présence de deux allèles déficients au même locus conduit à la maladie (Pasternak, 2003).

Les gènes responsables des maladies transmises sur le mode autosomique récessif sont localisés sur les autosomes. L'allèle muté responsable de la maladie est récessif sur l'allèle sauvage; les hétérozygotes sont sains et la maladie ne s'exprime que chez les homozygotes (Jean-Pierre et *al.*, 2004).

Dans les arbres généalogiques de maladies autosomiques récessives, celles-ci n'apparaissent que de loin en loin, avec peu de symboles en noir (Figure 3). Une maladie récessive se manifeste par groupes de descendants affectés au sein d'une même fratrie alors que les personnes des générations antérieures et postérieures ont tendance à ne pas être touchées. Pour en connaître la raison, il est important de comprendre la structure génétique des populations porteuses de telles affections rares. Par définition, si la maladie est rare, peu de personnes possèdent l'allèle anormal, et la plupart des personnes affectées sont hétérozygotes. Les hétérozygotes sont beaucoup plus fréquents que les homozygotes récessifs car les deux parents d'un tel homozygote doivent porter l'allèle *a* alors qu'un seul parent porteur suffit pour engendrer un hétérozygote.

L'apparition d'un individu affecté dépend habituellement de l'union aléatoire de deux hétérozygotes non apparentés. Toutefois, les unions consanguines (unions entre personnes de la même famille) augmentent le risque d'union entre hétérozygotes. La Figure 3 donne un

exemple de mariage entre cousins. Les individus III-5 et III-6 sont cousins germains et engendrent deux homozygotes pour l'allèle rare. Un ancêtre hétérozygote peut produire de nombreux descendants également hétérozygotes. Par conséquent, deux cousins peuvent porter le *même* allèle récessif rare, reçu d'un ancêtre commun. Pour que deux personnes *non apparentés* soient hétérozygotes, elles devraient avoir reçu l'allèle rare de leurs *deux* familles. Le risque de produire des maladies récessives est en général plus élevé pour les unions entre cousins germains produisant une proportion importante d'individus affectés de maladies récessives au sein de la population (Griffiths et *al.*, 2001).

Exemple d'affections récessives chez l'homme, la PCU (PhénylCétonUrie), une maladie due au métabolisme anormal de l'acide aminé phénylalanine, un composant de toutes les protéines de notre nourriture. La phénylalanine est normalement transformée en tyrosine (un autre acide aminé) par l'enzyme phénylalanine hydroxylase. Cependant, si une mutation dans le gène codant cette enzyme modifie la séquence d'acides aminés au voisinage du site actif de l'enzyme, l'enzyme ne peut ni fixer la phénylalanine (son substrat) ni la transformer en tyrosine. La phénylalanine s'accumule donc dans l'organisme et est transformée à la place en acide phénylpyruvique. Ce composé interfère avec le développement normal du système nerveux, entraînant ainsi un retard mental (Griffiths et *al.*, 2001).

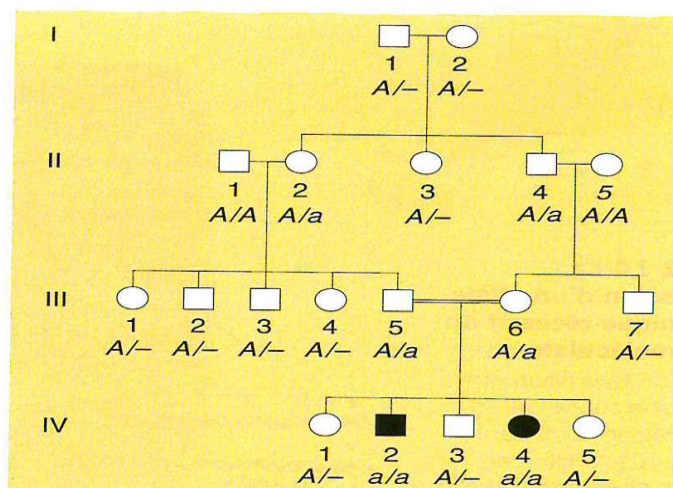


Figure 3 : Arbre généalogique d'un phénotype récessif rare déterminé par un allèle récessif *a*. (Griffiths et *al.*, 2001).

Les symboles des gènes ne sont normalement pas indiqués dans ce type de représentation mais les génotypes ont été rajoutés ici pour une meilleure compréhension. Les individus II-1 et II-5 sont arrivés dans la famille par mariage : ils sont supposés normaux car la maladie héréditaire examinée est rare. Il n'est pas possible d'être certain du génotype de certains individus présentant un phénotype normal : de tels individus sont désignés par *A/-*.

Le génotype des parents peut s'écrire :

Parents	Progénitures	
	Génotypes	Phénotypes
a/a x A/A	Tous A/a	Tous sains
a/a x A/a	1/2 a/a	1/2 atteints
	1/2 A/a	1/2 sains
a/a x a/a	Tous a/a	Tous atteints

Dans un mariage impliquant un homozygote atteint et un hétérozygote (le croisement a/a x A/a montré-ci-dessus), chaque enfant a une chance sur deux d'être atteint, tout comme dans le mode d'hérédité autosomique dominant. Les hétérozygotes étant beaucoup plus rares que les homozygotes normaux, des mariages successifs entre homozygotes atteints et hétérozygotes sont statistiquement improbables (Margaret *et al.*, 1995).

Caractéristiques généalogiques des maladies à transmission autosomique récessive

- Les deux sexes sont atteints avec une fréquence égale.
- Les deux parents sont en général sains, mais sont obligatoirement hétérozygotes.
- Dans les familles, les sujets atteints se retrouvent le plus souvent dans la même fratrie donnant une répartition horizontale sur l'arbre généalogique.

Risque de récurrence

Un couple d'hétérozygotes a un risque de 25% (1/4) d'avoir un enfant atteint à chaque nouvelle conception (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

La proportion d'unions consanguines est plus élevée dans l'ascendance des sujets atteints de maladies autosomiques récessives. On parle d'union consanguine quand les deux membres d'un couple ont au moins un ancêtre commun. Dans cette situation, l'homme et la femme ont un risque plus grand d'avoir reçu de leur ancêtre commun un allèle identique à un locus donné et d'avoir des enfants homozygotes pour cet allèle (Pasternak, 2003).

I.2 Hérité dominante autosomique

Les gènes responsables des maladies transmises sur le mode autosomique dominant sont localisés sur les autosomes (Figure 4). L'allèle normal est récessif et l'allèle anormal est dominant. Dans l'analyse des arbres généalogiques, les principaux indices permettant d'identifier une maladie autosomique dominante à transmission mendélienne sont la tendance du phénotype à apparaître à chaque génération et le fait que pères et mères affectés transmettent le phénotype à leurs filles comme à leurs fils. Le phénotype se manifeste à chaque génération car généralement, l'allèle anormal porté par un individu donné doit provenir d'un parent de la génération précédente (Griffiths et al., 2001).

Exemple : Une malformation dentaire rare (1/8000), la *Dentinogenesis Imperfecta* (DI) ; les dents ont une couleur brune opaques.

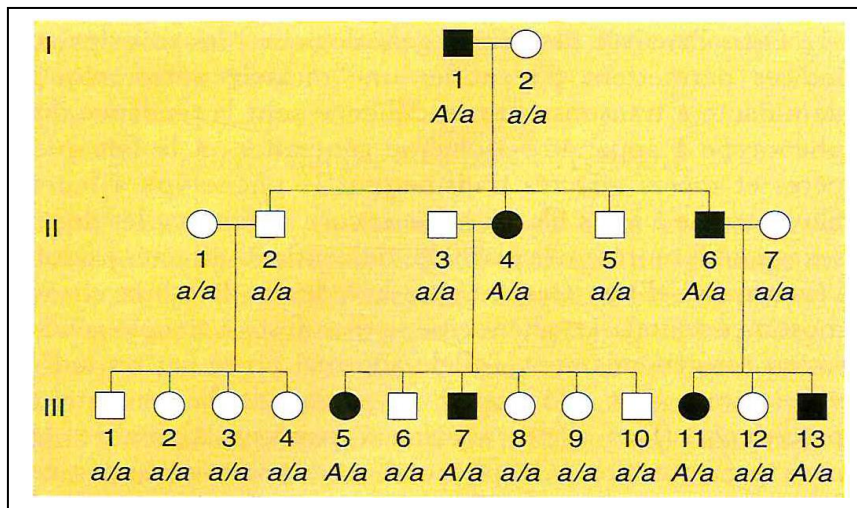


Figure 4 : Arbre généalogique d'un phénotype dominant déterminé par un allèle dominant A (Griffiths et al., 2001).

Le génotype des parents peut s'écrire :

$A/a \times a/a$: **A** est l'allèle dominant produisant le phénotype anormal ; **a** est l'allèle normal.

Descendance d'une union $A/a \times a/a$:

		a	a
Parent atteint	A	A/a Atteint	A/a Atteint
	a	a/a Normal	a/a Normal

Caractéristiques généalogiques des maladies à transmission autosomique dominante

- Une maladie est transmise selon le **mode autosomique dominant** si le gène en cause est porté par un autosome
- Les individus hétérozygotes (A/a) pour le gène en cause sont malades.
- Généralement, les individus homozygotes (A/A), s'ils sont viables, sont plus sévèrement atteints par la maladie.
- Les deux sexes sont atteints avec la même fréquence.
- La transmission de la maladie peut se faire par les deux sexes.
- Les transmissions père-fils sont pathognomoniques de l'hérédité autosomique dominante.
- Tout sujet porteur d'un allèle morbide autosomique dominante a un risque de 50% ($1/2$) de le transmettre à ses enfants quel que soit leur sexe.
- Les sujets atteints se retrouvent sur plusieurs générations et leur répartition apparaît verticale sur l'arbre généalogique (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

I.3 Hérité récessive lié à l'X

Dans le cas d'une maladie liée à l'X et récessive, tous les fils d'une mère malade sont atteints, les pères atteints ne transmettent jamais le trait à leurs fils, des parents sains peuvent donner naissance à des enfants atteints, et globalement, la maladie est plus fréquente chez les garçons que chez les filles (Pasternak, 2003).

Les maladies dont le gène est localisé sur le chromosome X se transmettent le plus souvent sur le mode récessif lié à l'X ; certaines sont transmises sur le mode dominant lié à l'X) (Jean-Pierre *et al.*, 2004). Les femmes hétérozygotes ne sont pas atteintes mais peuvent transmettre la maladie; elles sont dites **conductrices** de la maladie. La maladie ne se manifeste que chez les sujets de sexe masculin (XY) ne possédant qu'une seule copie du gène (sujets **hémizyotes**).

Exemple : L'hémophilie A est une affection hémorragique, héréditaire, transmise selon le mode récessif lié au chromosome X. Elle est due à un déficit quantitatif ou qualitatif en facteur FVIIIc, protéine agissant comme cofacteur dans la voie intrinsèque de la coagulation. Cette pathologie touche principalement les garçons à une fréquence de 1/5000 naissances masculines environ. Les femmes conductrices de la maladie sont en général asymptomatiques. Les cas de filles atteintes d'hémophilie A sont exceptionnels (Figure 5).

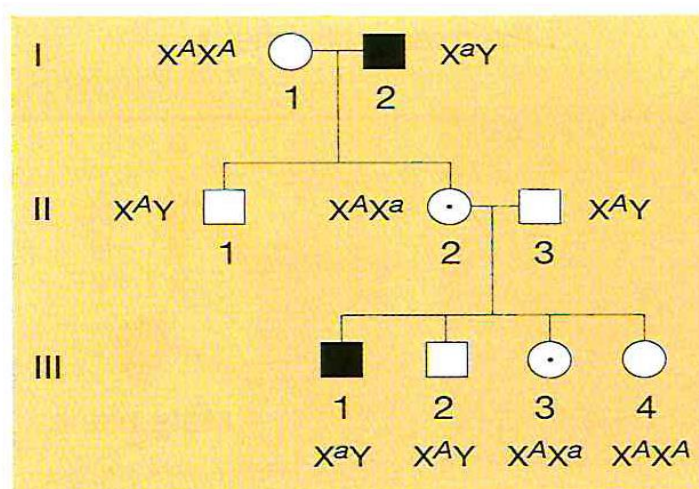


Figure 5 : Arbre généalogique montrant des allèles récessifs liés à l’X exprimés chez les hommes (Griffiths et *al.*, 2001).

A la génération suivante, ces allèles sont portés sans être exprimés chez les fils de celles-ci. Remarquez qu’on ne peut différencier II-3 et II-4 sur la base de leur phénotype.

Considérons un gène mutant lié à l’X, X^a (le gène représentant le gène responsable de l’hémophilie A ; l’absence de coagulation du sang), et l’allèle normal X^A . Étant donné que les garçons n’ont qu’un seul chromosome X alors que les filles en ont deux, il n’existe que deux génotypes possibles chez les garçons, contre trois chez les filles. Les garçons sont dits **hémizygotés** pour les gènes liés au chromosome X, tandis que les filles peuvent être homozygotes pour un des deux allèles, ou hétérozygotes.

	Génotypes	Phénotypes
Garçon	X^A	Sain
	X^a	Atteint
Fille	X^A/X^A	Homozygote sain
	X^A/X^a	Hétérozygote
	X^a/X^a	Homozygote atteint

Caractéristiques généalogiques des maladies récessives liées à l’X

- Seuls les garçons sont atteints.
- Dans les formes familiales, les sujets mâles atteints se retrouvent uniquement dans la lignée maternelle.
- Il n’y a aucun sujet atteint dans la lignée paternelle et l’on n’observe jamais de transmission père-fils.

Risques de récurrence

Les risques pour une femme conductrice sont les suivants :

- Un garçon sur deux est atteint.
- Une fille sur deux est conductrice.

Si un homme atteint se reproduit, aucun de ses enfants n'est malade, mais toutes ses filles sont conductrices.

I.4 Hérité dominante liée à l’X

Dans la transmission dominante liée à l’X l’allèle morbide se comporte comme un caractère dominant et se manifeste aussi bien chez les garçons hémizygotés que chez les filles hétérozygotes (souvent à un degré de gravité moindre).

Caractéristiques généalogiques des maladies dominantes liées à l’X et risque de récurrence

- Les hommes affectés transmettent la maladie à toutes leurs filles mais à aucun de leurs fils.
- Les femmes atteintes peuvent transmettre leur maladie aux enfants des deux sexes avec un risque de 1/2.
- Dans la descendance d’un homme atteint, toutes les filles reçoivent le gène muté; en revanche, il n’y a jamais de garçon atteint (pas de transmission père-fils) (Figure 6).

Il existe peu d’exemples de phénotypes dominants liés à l’X chez l’homme. L’un d’eux est l’hypophosphatémie, une sorte de rachitisme résistant à la vitamine D (Griffiths et *al.*, 2001).

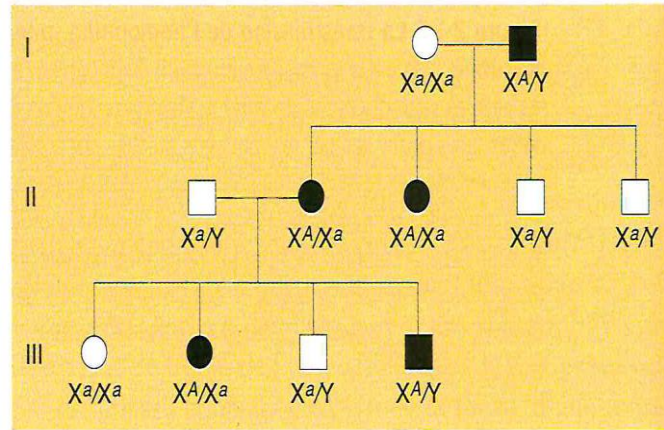


Figure 6 : Arbre généalogique d'une maladie dominante liée à l'X (Griffiths et *al.*, 2001).

Toutes les filles d'un homme exprimant un phénotype dominant lié à l'X présenteront ce phénotype. Les filles hétérozygotes pour un allèle dominant lié à l'X transmettront la maladie à la moitié de leurs fils et de leurs filles.

I.5 Hérité lié à l'Y

Pour une affection déterminée par un gène qui se trouve sur le chromosome Y, le mode de transmission est simple. Elle affectera uniquement les garçons et tous les garçons d'un homme atteint seront atteints (Figure 7). Les gènes situés sur le chromosome Y sont importants pour les fonctions sexuelles du garçon et les anomalies du chromosome Y sont une cause fréquente d'infertilité masculine (Donnai et Read, 2009).

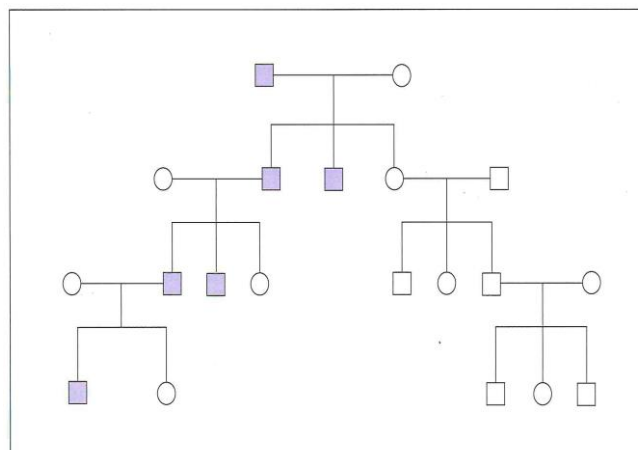


Figure 07 : Arbre généalogique montrant l'hérédité d'un caractère lié au chromosome Y. La transmission d'effectue uniquement d'homme à homme (Jorde et *al.*, 2004).

Caractéristiques généalogiques des maladies liées à l'Y

- Il n'y a pas de problème de dominance ou de récessivité au caractère lié à l'Y car il y a un seul chromosome Y.
- Seuls les garçons sont atteints.
- Les hommes atteints ont toujours des garçons atteints.

Chapitre II.

Facteurs qui rendent les profils de transmission mendélienne complexe

Chapitre II. Facteurs qui rendent les profils de transmission mendélienne complexe

II.1 Hétérogénéité du locus

Il arrive fréquemment que des mutations de plusieurs gènes différents entraînent le même phénotype clinique (hétérogénéité de locus). Les caractères qui résultent d'une voie complexe sont pratiquement toujours génétiquement hétérogènes. La surdité congénitale sévère est souvent d'origine génétique et, dans ce cas, habituellement autosomique récessive mais lorsque deux sujets atteints se marient, ce qui est fréquent, les enfants ont habituellement une audition normale (Figure 8). Cela constitue un exemple de **complémentation**. Le fait que les enfants soient normaux suggère que les parents ont des anomalies touchant différents gènes. Une telle hétérogénéité de locus doit être distinguée de l'hétérogénéité allélique (plusieurs mutations différentes à l'intérieur d'un gène donné entraînent la maladie (Strachan et Read, 1998).

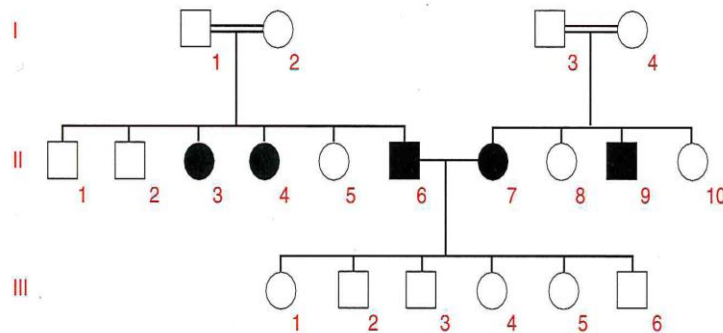


Figure 8 : Complémentation : les parents atteints de surdité autosomique récessive

profonde ont souvent des enfants dont l'audition est normale (Strachan et Read, 1998).

II-6 et II-7 sont les descendants de parents non atteints mais consanguins, et chacun a une fratrie atteinte : leur surdité est donc probablement autosomique récessive. Tous leurs enfants sont indemnes, montrant que II-6 et II-7 ont des mutations **non alléliques**. C'est un exemple de complémentation.

L'hétérogénéité génétique intéresse tous les modes de transmission mais est particulièrement illustrée par les maladies autosomiques récessives. On distingue :

- **Hétérogénéité allélique ou intralocus** qui rend compte du fait qu'une maladie peut être due à des mutations différentes (alléliques) dans le même gène (Une maladie / plusieurs allèles morbides). C'est ainsi que l'on connaît actuellement plus de 1000 mutations différentes du gène CFTR responsable de la mucoviscidose. Un individu malade portant deux mutations différentes au même locus est appelé **hétérozygote composite** (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

- **Hétérogénéité interlocus** se traduit par le fait qu'un phénotype apparemment identique peut être produit par des mutations dans des gènes différents (une maladie/plusieurs gènes). Par exemple, on a actuellement identifié plus de 150 gènes impliqués dans les rétinites pigmentaires (autosomique dominante, autosomique récessive et récessive liée à l'X) qui sont des affections dégénératives de la rétine (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

II.1.1 Action alternative des mutations dans des gènes différents

Le collagène de type I est l'invertébré protéique le plus abondant et un constituant de la matrice extracellulaire dans le tissu conjonctif des os, de la peau, des tendons, des ligaments et de la dentine. Il est principalement produit et sécrété par les fibroblastes et les ostéoblastes (Simon *et al.*, 2001).

La plupart des formes d'ostéogenèse imparfaite (OI) résultent de mutations ponctuelles dans les gènes (COL1A1 et COL1A2 qui codent les chaînes du procollagène de type I ou de mutations qui affectent l'expression de ces gènes. Moins fréquemment, des mutations qui affectent la taille de la chaîne peuvent également entraîner ces phénotypes (Byers, 1989). Les mutations dans les gènes qui codent les chaînes du collagène de type I, la principale protéine structurelle de la plupart des tissus, produisent généralement des os fragiles. Les conséquences de mutations même apparemment mineures - des substitutions de base unique - peuvent aller de létales à bénignes, et les conséquences phénotypiques reflètent la nature et la position de la mutation. La manière dont les phénotypes sont produits dépend de l'effet de la mutation sur l'intégrité structurelle de la molécule et de la possibilité ou de la manière dont les molécules anormales peuvent être incorporées dans une matrice extracellulaire (Byers, 1990).

II.1.2 Action simultanée de mutations dans différents gènes

Exemple 1: les maladies polygéniques telles que le Diabète Insulino-dépendant (DID)

Le MODY (*Maturity Onset Diabetes of the Young*) est une forme de diabète familial, à transmission autosomique dominante et à début précoce, associé à des anomalies primaires de l'insulinosécrétion. Des mutations dans six gènes (l'enzyme glucokinase et cinq facteurs de transcription exprimés dans le pancréas) sont responsables de la plupart des cas de MODY (Velho et al., 2003).

Exemple 2 : L'hypertension artérielle.

L'hypertension artérielle essentielle est une pathologie multifactorielle dont le déterminisme associe des facteurs environnementaux et génétiques (Jeunemaitre et Gimenez-Roqueplo, 2002). L'hypertension artérielle (HTA) de l'adulte, pathologie largement répandue dans la population et dont la fréquence augmente avec l'âge, est le plus souvent essentielle, terme qui traduit notre ignorance de sa physiopathologie (Bérard, 2008). Les mutations touchant des gènes dont les produits contrôlent la réabsorption du sodium par le tube rénal ont une incidence majeure sur la pression artérielle. Des mutations du récepteur des minéralocorticoïdes ont été rapportées chez des sujets atteints de pseudohypoaldostéronisme de type 1 avec syndrome de perte de sel et hypotension. L'hypothèse vient d'être testée de mutations activatrices du récepteur à l'origine d'hypertensions artérielles (Boitard, 2000).

II.2 Variation allélique et hétérogénéité clinique

- Plusieurs mutations au même locus qui entraînent plusieurs phénotypes différents pour la même maladie

Exemple 1 : Les myopathies de Duchenne (DMD) et de Becker (BMD) sont des formes alléliques d'une dystrophie musculaire transmise sur le mode récessif lié au chromosome X. Toutes deux résultent de mutations survenant dans un gène identifié en 1986 codant pour une protéine du cytosquelette membranaire, la dystrophine. Il s'agit de grandes délétions génomiques dans 60 % des cas environ, et de mutations ponctuelles dans la quasi-totalité des cas restants (Tuffery-Giraud et al., 1999).

Exemple 2 : La β -thalassémie intermédiaire est une définition clinique recouvrant un éventail allant de la forme sévère de la β -thalassémie majeure à la forme silencieuse du sujet hétérozygote. La pathologie moléculaire n'est encore que partiellement définie. Le génotype le plus fréquent est l'état homozygote β -thalassémique ou les formes composites associées à

une expression résiduelle élevée des chaînes β . Un groupe très intéressant de mutations peu sévères est celui des mutations complètement silencieuses à l'état hétérozygote (Cao *et al.*, 1995).

II.3 Pénétrance

La pénétrance est définie comme la proportion d'une population portant un génotype qui montre effectivement le signe clinique associé. La pénétrance est une propriété qui caractérise un gène et son phénotype. La pénétrance d'un trait phénotypique varie en fonction du syndrome clinique considéré. Les divers traits qui caractérisent un syndrome ont des pénétrances qui diffèrent.

La non pénétrance est un piège tant pour l'interprétation d'un arbre généalogique que pour le conseil génétique. La figure 9 en montre un exemple théorique : L'individu III-11 doit être porteur du gène de la maladie, même s'il semble indemne. S'il avait demandé un conseil génétique avant d'avoir des enfants, le généticien aurait dû intégrer le risque de non-pénétrance pour cette maladie dominante et en tenir compte avant d'établir le risque pour cet individu asymptomatique de donner naissance à un enfant souffrant de la maladie familiale (Donnai et Read, 2009).

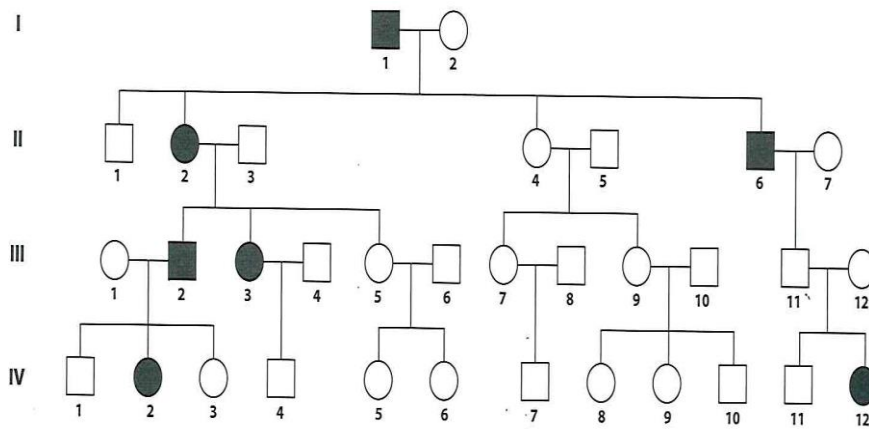


Figure 09 : Arbre généalogique d'une affection autosomique dominante avec une pénétrance réduite (Donnai et Read, 2009).

Cette affection concerne l'individu III-11 qui semble indemne mais porte en réalité un gène muté non-pénétrant. A la génération IV, les individus sains qui ont un parent atteint pourraient également être des porteurs non-pénétrant du gène.

La pénétrance d'un gène peut aussi varier en fonction d'autres paramètres: l'âge (par ex: la pénétrance du gène responsable de la chorée de Huntington est de 0 à la naissance, de 50% vers 40 ans et de 100% vers 70 ans) ou le sexe (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

La pénétrance d'un allèle morbide est définie par le rapport suivant ::

$$P = \frac{\text{Nombre d'individus atteints}}{\text{Nombre total d'individus hétérozygotes}} \times 100$$

La pénétrance est une grandeur exprimée en %. En cas de pénétrance **complète**, le rapport est de 1. Une pénétrance incomplète (exemple $P = 90\%$) signifie que 10% des personnes hétérozygotes n'expriment pas la maladie mais peuvent la transmettre. *Exemple* : le rétinoblastome.

Pourquoi un organisme aurait-il un génotype particulier et n'exprimerait pourtant pas le phénotype correspondant. Il y a plusieurs raisons possibles à cela (Griffith *et al.*, 2001) :

1- *L'influence de l'environnement*, les individus ayant le même génotype peuvent présenter une gamme variée de phénotypes, selon l'environnement dans lequel ils se trouvent. Il est possible que la gamme de phénotypes des individus mutants et des individus de type sauvage se chevauche : le phénotype d'un individu mutant apparu dans certaines circonstances peut correspondre au phénotype d'un individu de type sauvage apparu dans d'autres circonstances. Lorsque c'est le cas, il devient impossible de distinguer mutants et type sauvage.

2- *L'influence d'autres gènes*. Des gènes modificateurs, épistatiques ou supprimeurs dans le reste du génome, peuvent empêcher l'expression du phénotype caractéristique.

3- *La subtilité du phénotype mutant*. Les effets subtils dus à l'absence de la fonction d'un gène peuvent être difficiles à mesurer dans une étude en laboratoire.

II.4 Révélation tardive

Un cas particulièrement important de pénétrance réduite est observé dans les maladies à révélation tardive. Les maladies génétiques ne sont bien sûr pas toutes congénitales, c'est-à-dire présentes à la naissance. Le génotype est fixé lors de la conception, mais le phénotype peut ne se manifester qu'à l'âge adulte. Dans de tels cas, la pénétrance est liée à l'âge. La maladie de Huntington en est un exemple (Figure 10). Une révélation tardive peut être liée à

l'accumulation d'une substance nocive, à la mort tissulaire lente ou à une incapacité à réparer certaines lésions liées à l'environnement (Strachan et Reed, 1998). Cette maladie est causée par une expansion anormalement longue (>35) de répétitions CAG dans le gène de la huntingtine. L'âge de début est en partie déterminé par le nombre de répétitions. La suspicion de cette maladie se base sur un tableau clinique évocateur et une anamnèse familiale positive. Les troubles de la marche et de l'équilibre apparaissent souvent plus tard. L'atteinte cognitive touche principalement le domaine exécutif, et les troubles psychiatriques les plus caractéristiques sont l'irritabilité/agressivité, l'anxiété, la dépression, l'apathie et les troubles obsessionnels compulsifs. Il est recommandé de référer les patients avec suspicion de cette maladie à un centre spécialisé dans le diagnostic, les aspects de conseil génétique, ainsi que le suivi de cette maladie. Plusieurs traitements s'avèrent efficaces contre certains symptômes moteurs, comme la chorée, et psychiatriques. Toutefois, aucune de ces approches ne modifie le cours de la maladie et le patient décède après une à deux décennies d'évolution. Cependant, les mécanismes pathogéniques faisant le lien entre l'anomalie génétique et la présentation clinique sont de mieux en mieux compris et de nouvelles cibles moléculaires thérapeutiques ont été identifiées. En particulier, les progrès dans le domaine de la thérapie génique offrent des perspectives prometteuses (Good et *al.*, 2015).

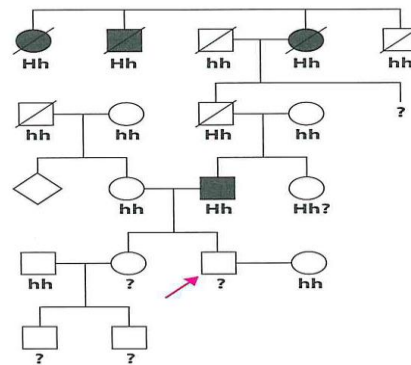


Figure 10 : Arbre généalogique avec la famille de Chorée de Huntington avec les génotypes (Donnai et Read, 2009).

Dans cet exemple, l'allèle lié à la maladie est dominant. Toutes les personnes atteintes dans la famille sont hétérozygotes. Lorsqu'on connaît ces maladies à l'état homozygote, leurs manifestations sont souvent plus sévères que celles observées chez les hétérozygotes. Un caractère génétique dominant quand il se manifeste les hétérozygotes, ce qui est le cas pour la

chorée de Huntington. L'état homozygote est connu pour la chorée : ces patients sont phénotypiquement identiques aux hétérozygotes (Donnai et Read, 2009).

II.5 Expression variable

Un allèle morbide peut s'exprimer par des signes cliniques différents d'un individu à l'autre. C'est le cas, par exemple, de la neurofibromatose de type I dont les signes peuvent varier chez les membres d'une même famille (Jean-Pierre et *al.*, 2004).

L'expression variable est liée au non pénétrance, fréquemment observée dans les maladies dominantes. La figure 11 montre l'exemple d'une famille atteinte du syndrome de Waardenburg. Plusieurs membres de la famille présentent différents aspects du syndrome. La cause est la même que pour la non-pénétrance : d'autres gènes ou des facteurs environnementaux ont une influence sur le développement des symptômes. La non-pénétrance et l'expression variable sont des problèmes fréquemment rencontrés avec les caractères dominants qu'avec les caractères récessifs. Cela reflète en partie la difficulté de détecter des cas non pénétrants dans un arbre généalogique typiquement récessif. Cependant, d'une façon générale, les traits récessifs sont moins variables que les traits dominants et cela est probablement lié au fait que le phénotype de l'hétérozygote correspond à l'équilibre entre les effets des deux allèles, le résultat étant probablement moins sensible aux influences extérieures que le phénotype de l'homozygote. Cependant, on rencontre occasionnellement la non-pénétrance et l'expression variable dans les maladies récessives (Strachan et Reed, 1998).

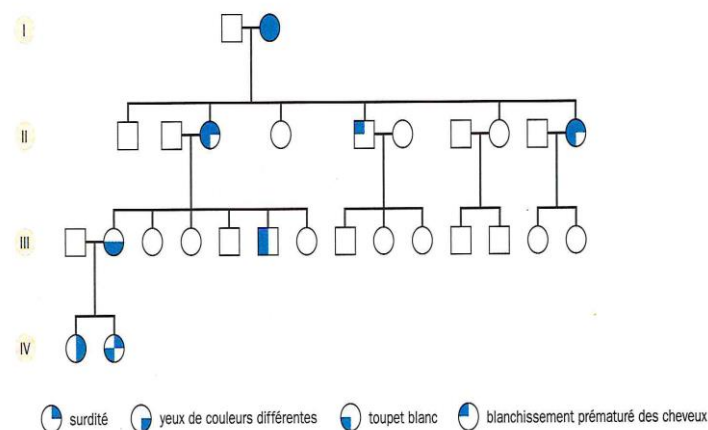


Figure 11 : Complications du schéma mendélien de base : expression variable (Strachan et Read, 2012).

Dans une même famille, des personnes ayant hérité de la même mutation peuvent parfois présenter des symptômes cliniques différents, touchant éventuellement des organes ou des tissus différents. On dit alors **que la maladie a une expressivité variable**.

- Ce phénomène est surtout observable dans les maladies dominantes.
- Certains porteurs de l'allèle muté peuvent n'avoir que des signes bénins. Ils ne sont pas considérés comme cliniquement malades et la transmission semble alors sauter une génération.

La neurofibromatose est une maladie dont les signes cliniques sont de nature et de gravité variables.

- Presque tous les patients présentent des taches cutanées café au lait.
- Associées à ces taches, les patients présentent selon les cas des tumeurs de la peau bénignes, des tumeurs des nerfs (neurofibromes, gliome du nerf optique) et des malformations du squelette.

Dans cette famille, le père (I-1) a transmis l'allèle muté à 4 de ses 5 enfants alors que deux seulement semblent atteints.

- Sa fille (II-4) et son fils (II-7) ont "transmis" la maladie à leur descendance bien qu'ils ne présentent que des symptômes bénins. La maladie semble ainsi sauter une génération.
- Ces observations sont conformes **au mode autosomique dominant avec expressivité variable de la maladie**.

Néomutations ou mutations *de novo*

Si un enfant est né avec une maladie génétique alors qu'il n'existe aucun antécédent de cette maladie dans la famille, il est possible que cette maladie soit le résultat d'une **mutation de novo**. Cela signifie que le gène transmis par l'un des parents a subi une modification de son ADN, provoquant une mutation qui a transformé l'allèle normal en allèle responsable d'une pathologie. Les gènes de ce locus se trouvant dans les autres cellules germinales du parent sont généralement normaux. Le risque de récurrence pour les futurs membres de la fratrie de ce patient est très faible. Cependant la descendance de l'enfant affecté peut présenter une augmentation assez importante du risque de survenue (c'est-à-dire de 50 % pour une maladie à transmission autosomique dominante) (Jorde et *al.*, 2003).

II.6 Inactivation de l'X

Chez la femme, un mécanisme de compensation génique propre au chromosome X aboutit à l'inactivation aléatoire de l'un des deux chromosomes X dans chacune de ses cellules. C'est Mary Lyon qui, en 1961, formule l'hypothèse d'un tel phénomène appelé aussi *lyonisation* de l'X (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

L'inactivation du chromosome X survient chez tous les mammifères et entraîne l'inactivation sélective des allèles portés par l'un des deux chromosomes X chez les femelles (Migeon, 1994). Elle permet une compensation du dosage. Ce mécanisme compense en effet les différences, selon le sexe, du dosage des gènes autosomiques et des gènes liés à l'X (deux pour un chez les mâles : un pour un chez les femelles) : les mâles, n'ayant qu'un chromosome X, sont *constitutionnellement* hémizygotés pour les gènes du chromosome X, mais les femelles deviennent *fonctionnellement hémizygotés* par inactivation des allèles d'un chromosome X parental (Strachan et Read, 1998).

Dans les cellules en interphase, le chromosome X inactif peut être vu en microscope sous forme de **corpuscule de Barr** ou chromosome sexuelle (Figure 12). Quel que soit le caryotype, chaque cellule somatique n'a qu'un seul chromosome X actif :

- Les mâles XY gardent leur seul chromosome X actif (pas de corpuscule de Barr).
- Les femelles XX inactivent un X dans chaque cellule (un seul de corpuscule de Barr).
- Les femmes présentant un syndrome de Turner (45,X) n'inactivent pas leur X (pas de corpuscule de Barr).
- Les hommes présentant un syndrome de Klinefelter (47,XXY) inactivent un X (un corpuscule de Barr).
- Les femmes 47,XXX inactivent deux chromosomes X (deux corpuscules de Barr).

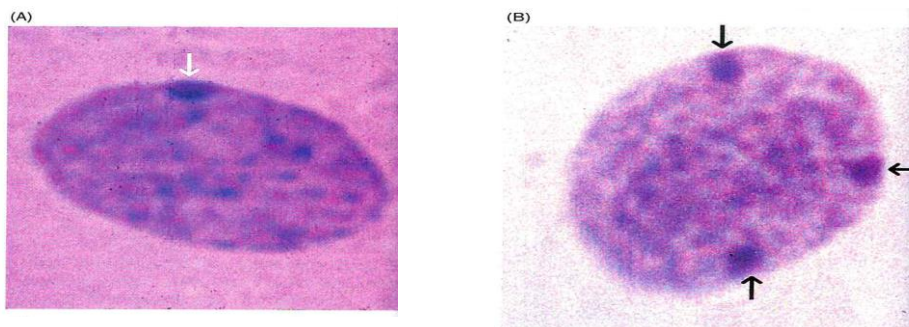


Figure 12 : Un corpuscule de Barr (Strachan et Read, 2012).

- (A) Une cellule de femme 46,XX a un chromosome X inactivé et présente un seul corpuscule de Barr.
(B) Une cellule d'un homme 49,XXXXY a trois chromosomes X inactivés et présente trois corpuscules de Barr.

L'inactivation du chromosome X se produit très tôt au cours de l'embryogenèse et entraîne une mosaïque fonctionnelle des gènes de l'X où 50% des cellules expriment l'X maternel et 50 % l'X paternel. Elle débute au niveau d'un centre d'Inactivation (*XIC*) situé dans la région *Xq13*, se propage le long du chromosome de façon discontinue (tous les gènes ne sont pas inactivés) et épargne les deux extrémités dénommées région pseudo-autosomiques, homologues des deux extrémités de l'Y. Le *XIC* contient le gène *XIST*, exprimé en *cis*, dont le transcrit, un ARN non traduit en protéine, s'accumule le long de l'X inactif. Il serait régulé négativement, sur l'X actif, par un ARN *antisens*, *TSIX*. L'inactivation est stable au cours des divisions cellulaires somatiques et la réactivation ne survient que pour les ovocytes. Ce processus de régulation est, pour une part, similaire à celui de l'empreinte génomique parentale (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

L'inactivation de l'X se produit, chez les femelles mammifères, à un stade précoce du développement ; elle est initiée au stade tardif de blastula chez la souris, et très probablement également chez l'homme. L'un des deux chromosomes X parentaux est inactivé *au hasard* dans chaque cellule qui donnera naissance à un fœtus féminin. Plus tard, le chromosome inactif le demeure habituellement dans toutes les cellules qui en dérivent, le profil d'inactivation du chromosome X étant hérité de façon clonale (Figure 13). Les femelles des mammifères sont donc des mosaïques, constituées d'un mélange de lignées cellulaires dans lesquelles le chromosome X paternel est inactivé et de lignées dans lesquelles le chromosome X maternel est inactivé (Strachan et Read, 1998).

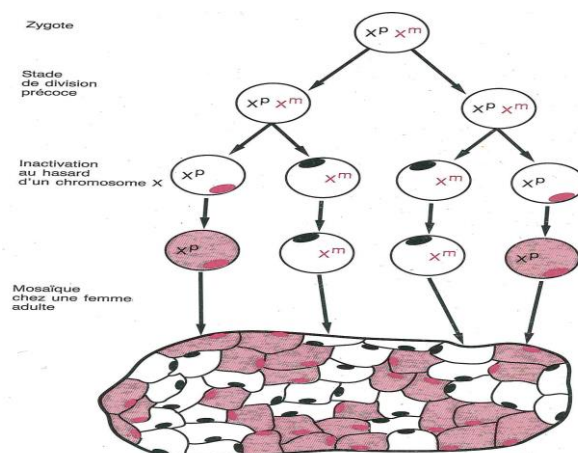


Figure 13 : Hypothèse de Lyon de l'inactivation au hasard du chromosome X dans les cellules somatiques de la femme (Margaret *et al.*, 1995).

X^P à chromosome X hérité du père. X^M = chromosome X hérité de la mère. Les structures ovales noires ou rouges représentent les corpuscules de Barr formés par l'inactivation des chromosomes respectivement paternels ou maternels. Les tissus adultes (en bas) constituent une mosaïque de populations clonales exprimant les allèles du chromosome X paternel ou maternel.

Une complication supplémentaire concernant les transmissions liées à l’X vient du phénomène de lyonisation, inactivation au hasard chez les filles de l’un des deux chromosomes X. Les femmes porteuses peuvent être hétérozygotes au niveau de l’organisme entier mais, au plan fonctionnel, chaque cellule exprime soit l’allèle normal soit l’allèle anormal (Strachan et Read, 1998).

II.7 Mosaïcisme et les chimères

Un individu dont l’organisme contient plusieurs lignées cellulaires génétiquement distinctes est appelé une **mosaïque** (Donnai et Read, 2009).

Les mosaïques et les chimères sont constituées d’au moins deux lignées cellulaires différentes. Le mécanisme de la mitose est destiné à permettre à chaque cellule dans l’organisme de contenir une réplique complète et identique des gènes présents dans l’œuf initial fécondé. Cependant des mutations peuvent survenir au cours du développement d’un organisme. De telles mutations post-zygotiques produisent des mosaïques contenant deux lignées cellulaires (ou plus) génétiquement distinctes. Le mosaïcisme peut affecter des tissus somatiques ou germinaux (Strachan et Read, 1998). Le mosaïcisme germinale est défini par la présence, dans une gonade, d’une double population de cellules germinales, certaine étant porteuses d’un exemplaire de l’allèle muté, d’autres de deux exemplaires de l’allèle normal du même gène. Le parent porteur de cette mutation germinale en mosaïque peut transmettre l’allèle muté à sa descendance. Ce concept est d’une grande importance pour le conseil génétique puisqu’il signifie que des personnes, non porteuses en apparence de la mutation, peuvent avoir plusieurs enfants atteints et la transmission du trait peut ressembler, dans cette famille, à une hérédité autosomique récessive avec plusieurs enfants malades issus de parents sains. Le mosaïcisme germinale a été décrit dans diverses affections dominantes (ex: la NF1 ou l’ostéogénèse imparfaite) ou liées au chromosome X (*exemple*: la dystrophie musculaire de Duchenne) (Jean-Pierre *et al.*, 2004).

Les chimères, à l’inverse, sont le résultat de l’agrégation de deux zygotes dans un seul embryon (Figure 14), ou bien de la colonisation limitée de l’un des jumeaux par les cellules de l’autre jumeau non identique (Strachan et Read, 1998).

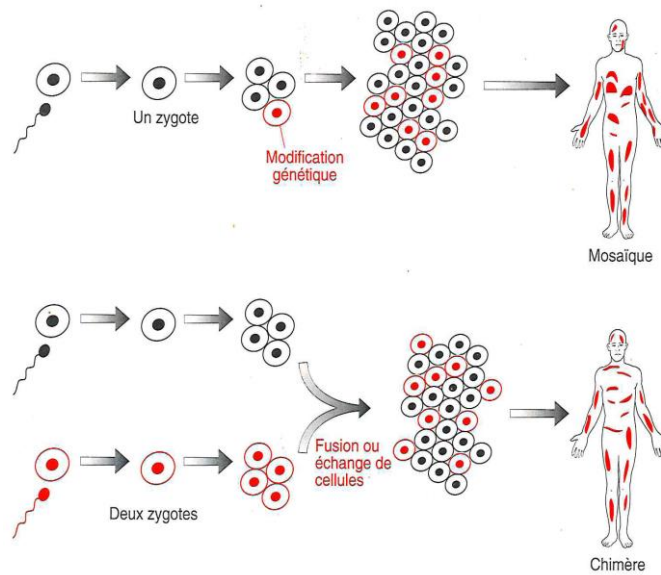


Figure 14 : Mosaïques et chimères (Strachan et Read, 1998).

II.8 Empreinte génomique et la disomie uniparentale

II.8.1 Empreinte génomique

Le terme d'empreinte génomique se rapporte au fait qu'un phénotype contrôlé par un gène ou un groupe de gènes se manifeste en fonction de l'origine parentale du gène ou du groupe de gènes en question (Rabinet, 1992).

1^{ère} observation : Les expériences de transfert de pro-noyaux haploïdes entre les zygotes fécondés ont révélé que les embryons monoparentaux, possédant donc deux génomes d'origine maternelle (gynogénotes ou parthénotes) ou paternelle (androgénotes), n'étaient pas viables (Paldi, 2006). La présence simultanée du génome paternel et du génome maternel dans le même zygote est nécessaire pour le développement normal (McGrath et Solter, 1984).

2^{ème} observation : les produits d'avortement humain triploïdes ; ils sont phénotypiquement différents selon que le génome supplémentaire est paternel ou maternel. Les môles qui sont composées principalement de tissu trophoblastique contiennent un complément dupliqué de chromosomes paternels. Les kystes dermoïdes qui sont différenciés

en un large spectre de tissus somatiques mais sans aucun élément placentaire, contiennent un complément de chromosomes maternels.

3^{ème} observation : les allèles paternel et maternel de certains gènes du génome ne s'expriment pas de façon identique au cours du développement (Pàldi, 2006).

Ces données et des observations similaires suggèrent que les génomes portent une empreinte de leur origine parentale qui, au moins dans certains cas, module leur activité. Cette empreinte doit être réversible, puisqu'un homme transmet ses gènes avec sa propre empreinte paternelle même si ces gènes lui ont été apportés de sa mère, donc avec une empreinte maternelle (Figure 15) (Strachan et Read, 1998).

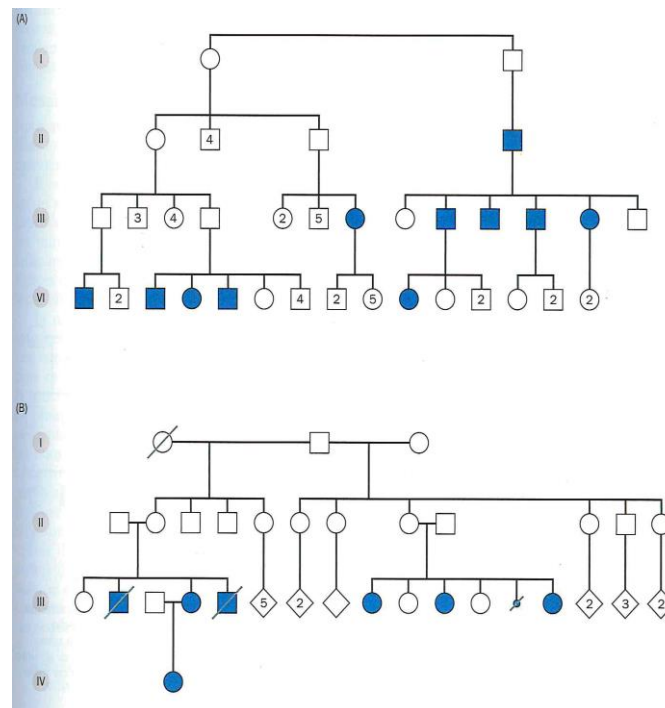


Figure 15 : Complication du schéma de base : expression génique soumise à empreinte (Strachan et Read, 2012).

(A) Dans certaines familles, les tumeurs de la carotide sont transmises comme un caractère autosomique dominant exprimé seulement lorsqu'il est transmis par le père. **(B)** Dans certaines familles, le syndrome de Beckwith-Wiedemann se présente comme un caractère autosomique dominant à forte pénétrance lorsqu'il est hérité de la mère mais à faible pénétrance lorsqu'il est hérité du père.

L'étude plus approfondie au niveau chromosomique et génétique montre que l'empreinte ne concerne qu'un nombre limité de gènes individuels ou de petites régions chromosomiques. Ainsi, la majorité des gènes portés par le chromosome 11 humain sont exprimés à partir des deux chromosomes, mais le gène *H19* l'est seulement à partir du chromosome maternel, tandis que le gène adjacent *IGF2* n'est exprimé qu'à partir du chromosome paternel (Strachan et Read, 1998).

II.8.2 Disomie uniparentale

Les cellules peuvent présenter un contenu chromosomique normal (par exemple, 46,XX ou 46,XY chez l'homme), mais une constitution chromosomique est en réalité anormale du fait d'un déséquilibre dans la répartition entre les chromosomes paternels et maternels. Le cas extrême est représenté par la diploïdie uniparentale, dans laquelle les chromosomes drivent tous d'un seul parent. Plus souvent ont pu être caractérisés des individus présentant deux copies d'un chromosome spécifique hérité d'un seul parent, soit deux homologues d'un même parent (**disomie uniparentale**) (*di* = deux), soit deux copies identiques d'un même homologue (**isodisomie uniparentale**) (Strachan et Read, 1998).

La diploïdie uniparentale entraîne l'absence de développement embryonnaire chez l'homme, et la disomie uniparentale ou l'isodisomie sont souvent à l'origine de maladies ; ces conséquences sont liées aux différences entre les homologues chromosomiques hérités de la mère et du père. Bien que les deux allèles maternel et paternel de la grande majorité des gènes soient équivalents quant à leur potentiel d'expression, certains gènes sont soumis à l'empreinte génétique, et l'une des copies paternelle ou maternelle est exprimée mais habituellement pas les deux (Strachan et Read, 1998).

La disomie uniparentale peut découler d'un certain nombre de situations. Par exemple, (1) une conception trisomique peut perdre l'un des chromosomes surnuméraires, ce qui entraîne la formation d'un embryon qui possède deux copies du chromosome apporté par un seul parent. (2) l'union d'un gamète contenant deux copies d'un chromosome donné avec un gamète qui ne contient aucune copie de ce chromosome et (3) dans les stades embryonnaires précoces, les cellules présentant une disomie uniparentale peuvent être produites à la suite d'erreurs mitotiques, par exemple une perte de chromosome avec duplication ultérieure du chromosome homologue (Jorde et *al.*, 2003) (Figure 16).

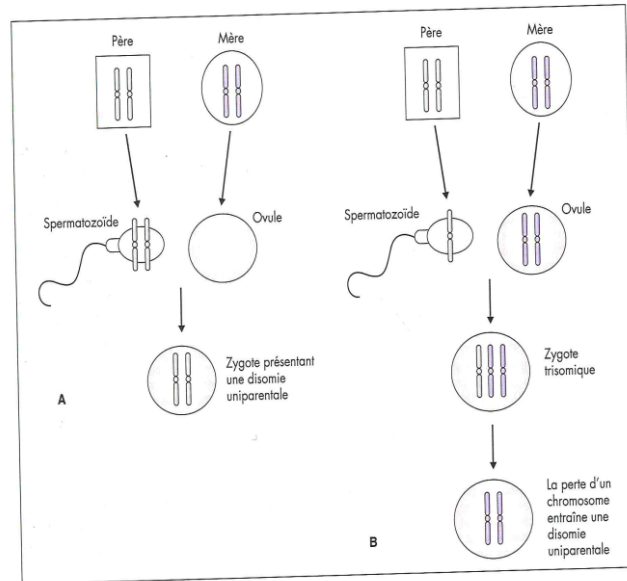


Figure 16 : Mécanismes pouvant conduire à une disomie uniparentale (Jorde et *al.*, 2003).

Des disomies uniparentales ont été décrites chez l'homme pour un grand nombre de chromosomes différents. Dans certains cas, les individus sont phénotypiquement normaux ; lorsqu'ils sont anormaux, il peut être difficile de déterminer si les anomalies résultent de la disomie uniparentale elle-même ou d'une homozygotie pour des allèles mutants particuliers que le chromosome peut porter (Strachant et Read, 1998).

Pour certains chromosomes, les disomies uniparentales n'ont pas d'effet phénotypique et, pour d'autres, elles produisent des phénotypes anormaux viables (parfois complémentaires pour les origines parentales différentes ; par exemple, excès de croissance en cas de disomie uniparentale maternelle et retard de croissance en cas de disomie uniparentale paternelle) ; enfin, pour certains chromosome, les disomies uniparentales sont létales (Strachan et Read, 1998).

Chapitre III.

Hérédité extrachromosomique ou hérédité mitochondriale

Chapitre III. Hérité extrachromosomique ou hérité mitochondriale

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présents en grand nombre dans les cellules eucaryotes, impliquées dans de nombreuses fonctions biologiques dont la principale est la production d'ATP à partir de la phosphorylation oxydative par la chaîne respiratoire mitochondriale. Le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est tributaire de l'intégrité des deux génomes, mitochondrial et nucléaire (Pennisi *et al.*, 2022). Dans l'espèce humaine, les mitochondries présentes dans le zygote proviennent de l'ovocyte, c'est à dire de la mère, et presque jamais du spermatozoïde, c'est-à-dire du père. Ce mode de transmission est appelé hérité maternelle (Figure 17). Un ovocyte humain comporte approximativement 100 000 mitochondries, mais il en perd un grand nombre lors de sa maturation. Les estimations du nombre de mitochondries varient entre moins de 10 et 100 au plus.

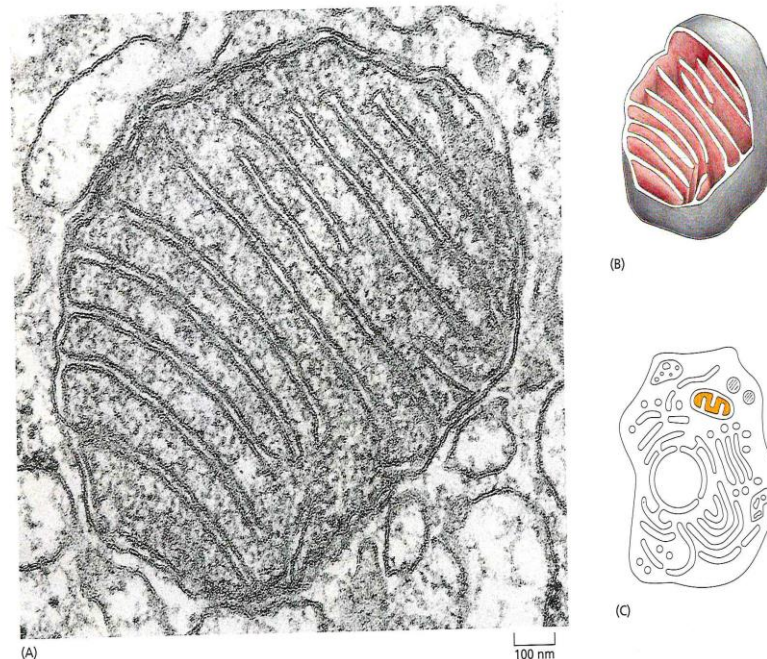


Figure 17 : Les mitochondries ont une structure caractéristique (Bray *et al.*, 2012).

(A) Une coupe transversale d'une mitochondrie, vue au microscope électronique, révèle les replis très importants pour la membrane interne. **(B)** Représentation en trois dimensions de l'organisation des membranes mitochondriales. Elle montre la membrane externe lisse et la membrane interne très contournée. **(C)** Schéma d'une cellule : l'espace intérieur d'une mitochondrie est coloré.

Il a été reconnu depuis plusieurs années qu'un petit nombre d'arbres généalogiques de certaines maladies héréditaires ne pouvaient s'expliquer en tenant compte de l'hérité mendélienne des gènes nucléaires. Une exception particulière était la maladie de Leber (neuropathie optique héréditaire de Leber, ou LHON), qui s'exprime phénotypiquement comme une perte bilatérale et rapide de la vision centrale due à la mort du nerf optique chez les jeunes adultes. Les individus atteints peuvent être garçons ou filles. La particularité des arbres généalogiques de LHON est que tous les patients sont toujours reliés entre eux par la mère, et qu'aucun des hommes atteints ne transmet la maladie (Figure 18).

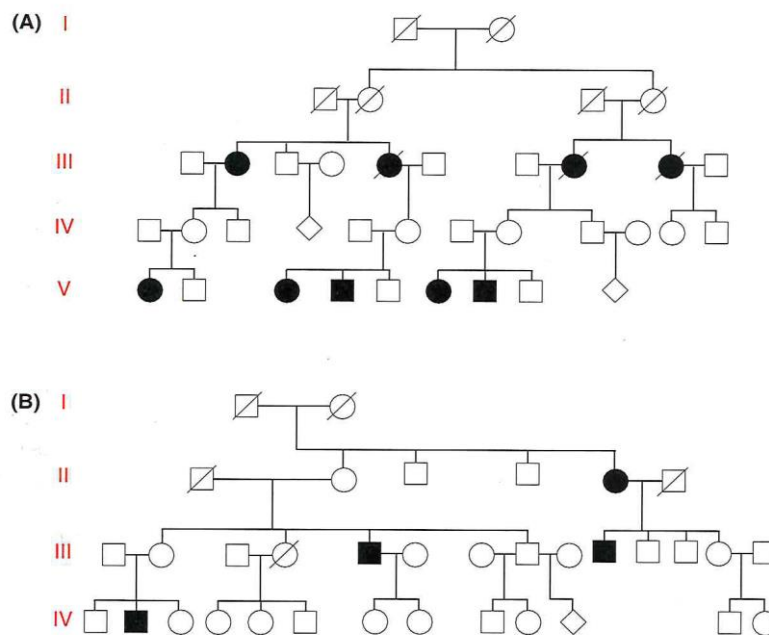


Figure 18 : Arbre généalogique de maladie mitochondriale (Strachan et Read, 1998).

(A). Profil de transmission, montrant une surdité d'origine mitochondriale. **(B).** Profil atypique d'atrophie optique héréditaire de Leber, atteignant principalement les hommes.

1. Génome mitochondrial et sa pathologie

L'ADN mitochondrial constitue une entité autonome, physiquement distincte de l'ADN nucléaire. Sa courte taille lui a permis d'être séquencé dès 1981 (Sanger). Il est constitué par :

- Un ADN circulaire, double brin, de **16 569 paires de bases**, extrêmement compacté puisque 93% de la séquence est codante (Figure 19).
- Composé de **37 gènes**, dépourvus d'introns et parfois chevauchants. Treize codent des chaînes polypeptidiques participant, en association avec des polypeptides codés par le génome nucléaire ; 2 gènes codent des **ARN ribosomaux** ; 22 codent des **ARNt**.
- La transcription est **polycistronique**, avec une maturation post-transcriptionnelle.
- Le **code génétique** mitochondrial est particulier : UGA n'est pas un stop mais un codon tryptophane, AGA et AGG sont des codons stop au lieu d'être des codons arginine, AUA code la méthionine au lieu de l'isoleucine. (Kaplan et Delpech, 2007).

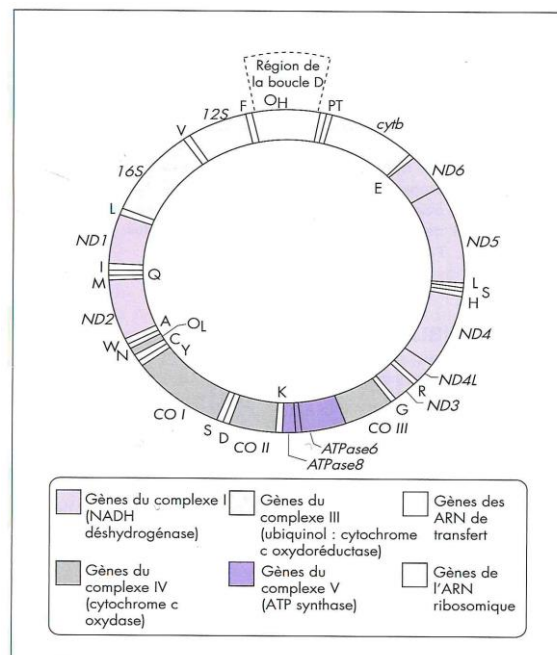


Figure 19 : Génome de l'ADN mitochondrial circulaire (Jorde et *al.*, 2003).

2. Pathologies mitochondriales

Les maladies mitochondriales sont des pathologies fréquentes du métabolisme caractérisées par une forte hétérogénéité clinique et génétique. Ces maladies mitochondriales peuvent survenir à n'importe quel âge de la vie et les présentations cliniques sont

extrêmement variables touchant les tissus fortement consommateurs d'énergie comme muscle ou cerveau mais tous les organes sont susceptibles d'être atteints. Plusieurs centaines de mutations de l'ADNmt ont pu être ainsi identifiées responsables de pathologies mitochondriales. Différents types de mutations de l'ADNmt, mutations ponctuelles, délétions ou déplétion de l'ADNmt ont pu être répertoriés (Bris *et al.*, 2018).

Le terme *homoplasmie* décrit la situation où toutes les mitochondries d'une cellule ou d'un tissu possèdent le même génome, qui est soit de type sauvage, soit porteur d'une mutation. *L'hétéroplasmie* qualifie l'état d'une cellule ou d'un tissu hébergeant simultanément des génomes mitochondriaux sauvages et mutés (Pasternak, 2003) au sein d'une même cellule, et que l'apparition et la sévérité des maladies mitochondriales dépendront alors de ce taux d'hétéroplasmie (Figure 20).

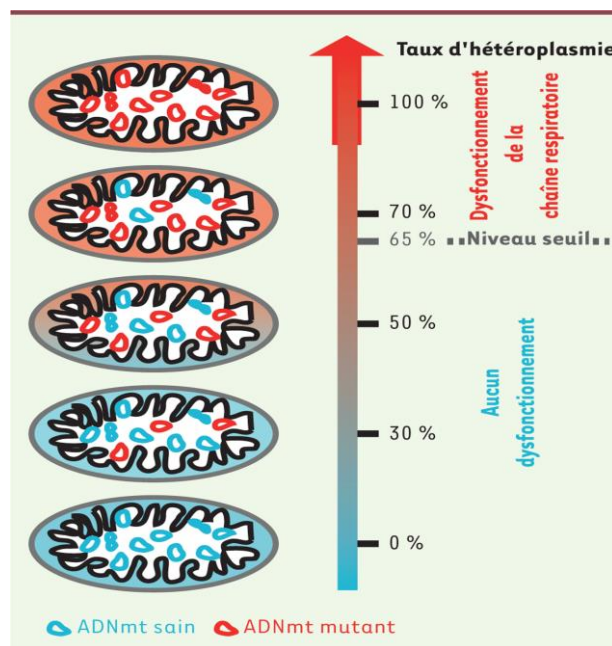


Figure 20 : Principe de l'hétéroplasmie (Tonin et Entelis, 2014).

L'ADNmt sain (en bleu) et muté (en rouge) mais, au-delà d'une certaine proportion de molécules d'ADNmt muté, des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire vont apparaître. Cette proportion de molécules est variable en fonction du tissu atteint, du type de mutation et de l'âge du patient, et se situe en moyenne autour de 65 %.

3. Génétique mitochondriale n'est pas mendélienne

Elle se distingue de la génétique nucléaire par les caractéristiques suivantes :

- Il y a environ 10 molécules d'ADN par mitochondrie et plusieurs centaines de mitochondries soit en tout **1 000 à 10 000 copies** d'ADNmt par cellule ;

- Lors de la formation du zygote, les mitochondries sont apportées par l'ovule et se distribuent dans les premières cellules filles où il n'y a pas encore de synthèse de l'ADNmt. Dans les formes familiales, la pathologie de l'ADNmt est à **hérité maternelle** ;

- Le taux de mutation de l'ADNmt est 10 fois plus élevé que celui de l'ADN nucléaire. Cette instabilité a été attribuée à l'absence d'histones, à la pauvreté des systèmes de réparation, à la production par la chaîne respiratoire d'une grande quantité de **radicaux libres** ;

- La réplication de l'ADNmt est indépendante de la mitose cellulaire ;

- Pas de recombinaison entre molécules de l'ADNmt ;

- Au cours de la mitose, les mitochondries se répartissent au hasard dans chaque cellule fille. Si la cellule d'origine contenait de départ deux types de mitochondries, cette ségrégation mitotique engendre une distribution aléatoire dans la descendance cellulaire. Il en résulte dans une même cellule, ou un même tissu, une proportion variable de molécules d'ADNmt normal et muté. Cette caractéristique, appelée **hétéroplasmie**, peut s'accompagner d'un effet de seuil dans ses manifestations cliniques ;

- Les conséquences phénotypiques des mutations sont ainsi variables d'une cellule à l'autre, d'un tissu à l'autre, d'un individu à l'autre (Kaplan et Delpech, 2007).

Chapitre IV.
Diagnostic génotypique

Chapitre IV. Diagnostic génotypique

IV.1 Définition

L'analyse du génome humain à des fins diagnostiques est entrée en vigueur vers la fin des années 1970, lorsque les premières sondes de globine furent appliquées à l'étude des hémoglobinopathies. L'analyse de l'ADN génomique de n'importe quelle cellule nucléée permet d'effectuer un diagnostic moléculaire des maladies génétique constitutionnelles monofactorielles récessives ou dominantes dont le gène est connu ou localisé. Il présente l'intérêt d'être véritablement étiologique puisqu'on analyse la cause première de la maladie. Il permet donc de valider le diagnostic chez un individu symptomatique et d'effectuer un conseil génétique dans la famille, par la détection des sujets transmetteurs et par le diagnostic prénatal dans les grossesses à risque (Kaplan et Delpech, 2007).

De façon général, deux types d'approches permettent d'identifier un allèle délétère : une approche **directe** basée sur la mise en évidence de la mutation responsable de la maladie, et une approche **indirecte** reposant sur une étude de liaison entre le locus morbide et des marqueurs polymorphes de l'ADN situés à proximité ou au sein du gène (Serre et *al.*, 2002).

L'avantage de l'analyse directe est considérable dans l'hémophilie où il faut déterminer le statut de conductrice des femmes : l'identification de la mutation pathogène chez un hémophile permet de proposer un dépistage simple de toutes les conductrices de la famille, même pour des femmes généalogiquement éloignées des hémophiles. A l'inverse, l'approche indirecte impose souvent d'étudier de nombreux membres de la famille, et ne peut permettre de déterminer le statut de la mère d'un hémophile sporadique (les mères des individus atteints ne sont pas obligatoirement conductrices car dans un cas sur trois il peut s'agir d'une *néomutation* (Serre et *al.*, 2002).

IV.2 Outils du diagnostic génotypique

2.1 Southern-blot

Le principe de la méthode de Southern a été inventé en 1975 par Ed. Southern, ce procédé permet de visualiser une séquence unique au sein d'un génome complexe par la seule vertu d'une hybridation moléculaire avec une sonde complémentaire unique. Cette reconnaissance très spécifique ne peut être visualisée que si la cible est contenue dans un ou plusieurs fragments séparables par électrophorèse.

1) Dans cette technique, l'ADN cible est digéré par une ou plusieurs endonucléases de restriction, fractionné selon la taille par électrophorèse sur gel d'agarose, dénaturé et transféré sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon pour être hybridé (Figure 21). Au cours de l'électrophorèse, les fragments d'ADN chargés négativement, migrent de l'électrode négative vers l'électrode positive, à travers le gel poreux.

2) Après l'électrophorèse, les fragments d'ADN sont dénaturés dans de forte concentrations salines. Le gel d'agarose étant fragile, et l'ADN pouvant diffuser dans le gel, les fragments d'ADN dénaturés sont transférés (*blotting*) sur une membrane de nitrocellulose ou de nylon sur laquelle l'ADN simple brin se fixe facilement. Les fragments d'ADN sont immobilisés sur la membrane ; leur position reflète parfaitement la séparation selon la taille obtenue après l'électrophorèse sur gel d'agarose.

3) Les séquences d'ADN cible simple-brin ainsi immobilisés sont ensuite mise en présence de la sonde d'ADN simple-brin marquée. La sonde se fixe seulement sur les séquences d'ADN homologues dans l'ADN cible, et leur position sur la membrane peut être comparée au gel original afin d'en estimer la taille (Strachan et Read, 1998).

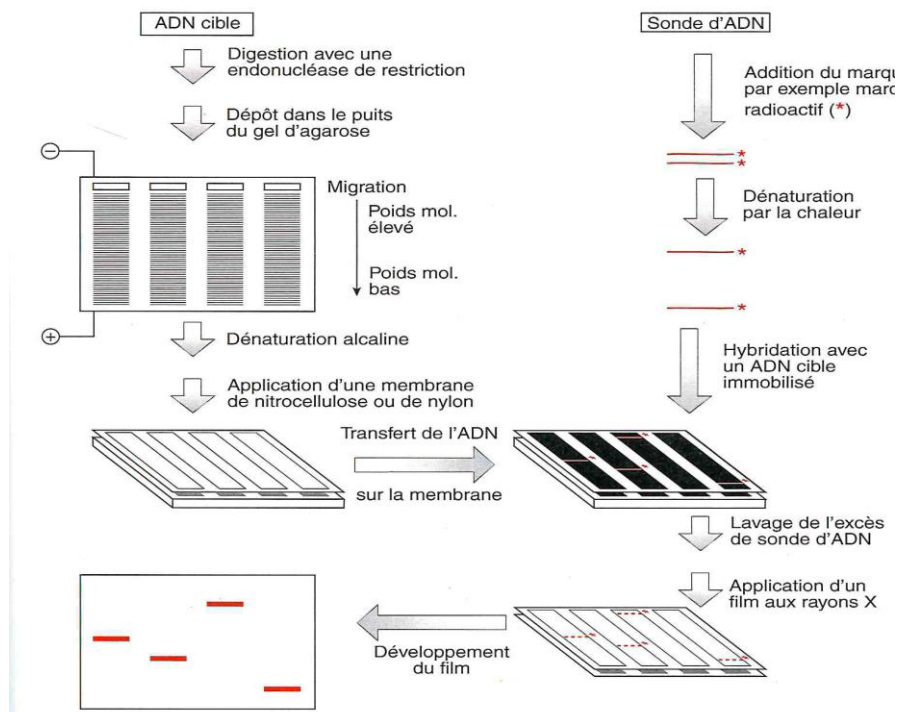


Figure 21 : Hybridation en Southern-blot détecte des fragments d'ADN cible qui ont été séparés selon leur taille par électrophorèse sur gel (Strachan et Read, 1998).

2.2 Sondes génétiques

Toute séquence d'acide nucléique ADN ou ARN, d'au moins 20 nucléotides, identique à une séquence présente dans un échantillon d'ADN simple brin ou d'ARN, s'hybride avec celles-ci de façon stable et spécifique par réassociation complémentaire selon la règle de Watson et Crick. Cet appariement entre la **sonde** et la **cible** peut s'effectuer quel que soit la proportion de la séquence cible dans l'échantillon exploré. Le phénomène est d'une grande **spécificité** puisqu'une sonde est capable de reconnaître une séquence unique parmi des millions d'autres (Kaplan et Delpech, 2007).

L'obtention des sondes est conditionnée par la connaissance du gène en cause ou de la séquence de la région génomique que l'on veut explorer.

En pratique il existe deux types de sondes :

- **Sondes directes** : il s'agit de toute séquence d'ADN (ou d'ARN correspondant à la totalité ou à une partie d'un gène donné, le reconnaissant spécifiquement et capable de mettre en évidence un événement mutationnel. L'hybride formé n'est stable que si au moins 20 nucléotides consécutifs participent à la formation du duplex.

Il existe cinq types de sondes directes :

- *Sondes d'ADNc* : elles correspondent exclusivement à des séquences **exoniques**. Elles sont obtenues à partir de messagers purifiés ou enrichis, provenant en particulier de cellules où ils sont fortement exprimés. Elles peuvent provenir d'une banque d'ADNc clonés. Elles peuvent être directement produites par RT-PCR, où l'amplification est précédée par une étape de transcription inverse.

- *Sondes d'ADN génomique* : elles sont obtenues soit à partir de banques génomiques d'ADN cloné dans une bactérie, soit plus simplement par réaction PCR effectuée sur l'ADN génomique de l'espèce étudiée.

- *Ribosondes* : ce sont des séquences d'ARN simple brin. Elles sont obtenues par voie biologique en transcrivant *in vitro*, par une ARN polymérase, un fragment d'ADNc ou d'ADN génomique inséré dans un vecteur pourvu d'un promoteur fort.

• *Oligonucléotides de synthèse* : ce sont de courtes séquences (20 à 30 nucléotides) d'ADN monobrin, synthétisées *in vitro* par les moyens de la chimie organique dans des appareils automatisés.

• *Sondes d'ADN d'organismes étrangers* : elles proviennent du génome des microorganismes pathogènes (bactéries, virus, parasites), dont un nombre croissant est entièrement séquencé.

- **Sondes indirectes**

Elles servent à explorer les sites polymorphes servant de **marqueurs génétiques** si tués entre les gènes, ou à l'intérieur de ceux-ci, le plus souvent dans un intron. Elles sont obtenues, soit à partir de banques génomiques, soit à partir d'ADN amplifié sélectivement *in vitro* par PCR. Ces marqueurs génétiques sont utilisés lorsque le gène ou la mutation que l'on veut explorer ne sont pas encore identifiés. Pour être utilisable une sonde indirecte doit satisfaire aux critères suivants :

- Etre précisément positionnée sur la carte génétique du génome, où elle correspond à un locus donné ;

- Mettre en évidence un **polymorphisme** utilisable comme marqueur génotypique

- Ne pas contenir de séquence d'ADN hautement répétitif dispersé (membre de la famille *Alu* par exemple) afin de reconnaître une seule ou un nombre minime de séquence dans le génome.

Le plus souvent, mais non obligatoirement, les sondes obéissant à ces critères correspondent à des séquences intergéniques et ne renferment pas de séquence codante. On les appelle **sondes anonymes** pour souligner qu'elles sont constituées par des séquences a priori dénuées de contenu informationnel.

2.3 PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

L'utilisation de la PCR (Mullis et *al.*, 1986) permet d'amplifier une région définie du génome. La technique d'amplification par polymérisation en chaîne résumée sur la figure, nécessite quatre composants (Jorde et *al.*, 2004) :

1- Deux amorces, chacune comprenant 15 à 20 bases d'ADN. Ces petites séquences d'ADN sont désignées par le terme **oligonucléotides** (*oligo* : quelques). Ces amorces correspondent aux séquences d'ADN immédiatement adjacentes à la séquence à examiner

(par exemple une séquence qui contient un polymorphisme de séquence répétée en tandem ou une mutation provoquant une maladie). Les amorces d'oligonucléotides sont synthétisées à l'aide d'un automate de laboratoire.

2- Une ADN polymérase, une forme thermostable de cet enzyme, obtenue initialement à partir de la bactérie *Thermus aquaticus*, effectue le processus essentiel de la réplication de l'ADN (désigné ici par le terme **extension d'amorce**).

3- Un grand nombre de désoxynucléotides libres.

4- L'ADN génomique d'un individu. Grâce à l'extrême sensibilité de l'amplification en chaîne, la quantité de cet ADN peut être très réduite.

La dénaturation de l'ADN génomique est tout d'abord chauffé à une température relativement élevée (environ 95°C) afin qu'il soit dénaturé et qu'il passe à l'état monocaténaire. Il est ensuite exposé à de grandes quantités d'amorces, qui s'hybrident avec les bases complémentaires appropriées de l'ADN génomique lorsqu'il est refroidi jusqu'à une température d'appariement de 35 à 65°C. L'ADN est ensuite chauffé à une température intermédiaire (70°C à 75°C). En présence d'un grand nombre de désoxynucléotides libres, un nouveau brin d'ADN est synthétisé par l'ADN polymérase à cette température, brin qui s'étend à partir de l'amorce. L'ADN nouvellement synthétisé est composé d'un double brin qui présente l'extrémité 5' de l'amorce à une extrémité suivie des bases ajoutées lors de l'extension d'amorce par l'ADN polymérase. Cet ADN double brin est à nouveau chauffé à une température élevée, ce qui provoque sa dénaturation. Le cycle chauffage-refroidissement est ensuite répété. A ce stade, l'ADN nouvellement synthétisé est utilisé comme matrice pour une synthèse complémentaire ; le nombre de copies double à chaque cycle (c'est à dire 2, 4, 8, 16, ... etc). Les cycles sont répétés 20 à 30 fois, ce qui permet d'obtenir des millions de copies de l'ADN original. En résumé, la technique de polymérisation en chaîne comporte trois étapes principales : dénaturation de l'ADN à haute température, hybridation de l'amorce à basse température et extension d'amorce à température intermédiaire. Le résultat obtenu est un produit composé presque exclusivement d'une séquence d'ADN définie (Figure 22).

Avantages de la PCR

➤ Elle peut être utilisée avec des quantités extrêmement réduites d'ADN (généralement des quantités de quelques nanogrammes). La quantité d'ADN contenue dans une tache de sang vieille de plusieurs années, un simple cheveu ou même le verso d'un timbre-poste humidifié avec la langue est souvent suffisant pour une analyse.

- La procédure est beaucoup plus rapide que la technique antérieure (Jorde et *al.*, 2004).

Inconvénients de la PCR

- La synthèse de l'amorce nécessite évidemment la connaissance de la séquence d'ADN située à proximité de l'ADN analysé.
- Son extrême sensibilité l'expose à des contaminations de laboratoire.
- Enfin, dans la mesure où il est difficile d'appliquer l'amplification en chaîne à des séquences d'une taille supérieure à quelques kb, elle ne peut pas être utilisée pour détecter des délétions plus importantes (c'est à dire qu'il est difficile, voire impossible, d'amplifier la séquence normale plus longue) (Jorde et *al.*, 2004).

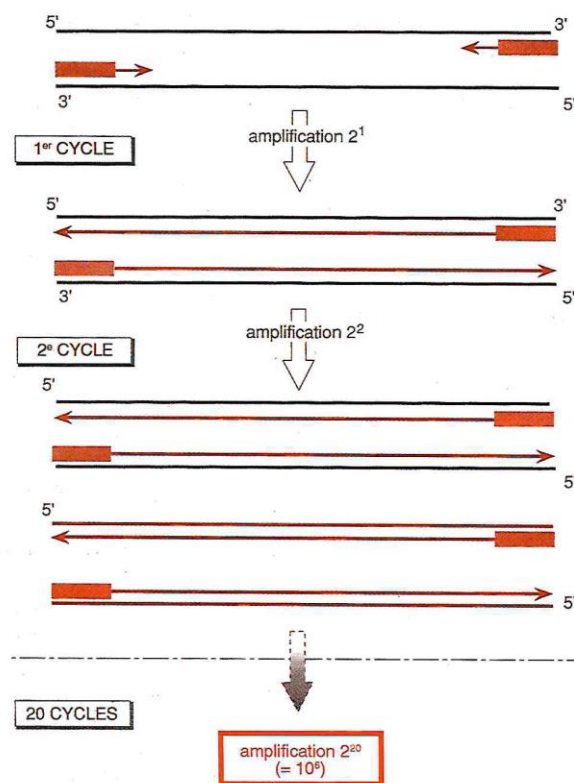


Figure 22 : Amplification élective in vitro (PCR)d'un segment d'ADN compris entre deux amorces de l'ADN simple brin (Kaplan et Delpeche, 2007).

2.4 Séquençage

Le séquençage du génome (ou profilage génomique complet) est un test complet qui permet de détecter presque toutes les variations de l'ADN d'un génome. Le séquençage permet de diagnostiquer la plupart des plus de 6000 maladies dont on connaît actuellement l'origine génétique. Cela inclut la fibrose kystique, la dystrophie musculaire de Duchenne, l'hypercholestérolémie familiale, l'hémophilie A, le syndrome de Lynch, le syndrome de Marfan et la néoplasie endocrinienne multiple (NEP) (Costain et *al.*, 2022).

Le séquençage du génome est un processus en 3 étapes. Premièrement, un généticien ou autre professionnel de la santé recueille les renseignements nécessaires sur le phénotype et les antécédents familiaux. Deuxièmement, le génome est séquencé, puis les résultats sont passés en revue par un généticien de laboratoire. Troisièmement, un médecin compare les observations génétiques et le phénotype clinique. Les résultats principaux sont les variations génétiques qui peuvent expliquer en tout ou en partie le tableau clinique. La mise en évidence de ces variations est le principal objectif du séquençage du génome en tant que test diagnostique clinique. La communication des résultats fait partie intégrante du cadre qui régit le counseling génétique et elle relève souvent du médecin généticien ou du conseiller en génétique (Costain et *al.*, 2022).

Tous les séquençages à l'échelle d'un génome, qui ont été effectués avant le Projet Génome Humain et dans le cadre de ce projet, ont utilisé la méthode de terminaison de chaîne développée par Frederick Sanger en 1974. L'idée dans la méthode de Sanger, est de générer toutes les molécules d'ADN simple brin complémentaires d'une matrice, qui commencent à une même position du côté 5' et qu'on allonge de façon aléatoire sur une distance allant jusqu'à kilobase, du côté 3'. Ces molécules simples brins sont marquées de sorte à pouvoir identifier la nature de la dernière base incorporée en 3' dans chaque molécule. La séparation électrophorétique des molécules en fonction de la taille génère une échelle de bandes, où chaque bande correspond à un ensemble de molécules qui ont un nucléotide de plus ou de moins que les molécules d'une bande adjacente. La lecture de la séquence se fait alors le long de cette échelle comme le montre la figure 23 (Gipson et Muse, 2004).

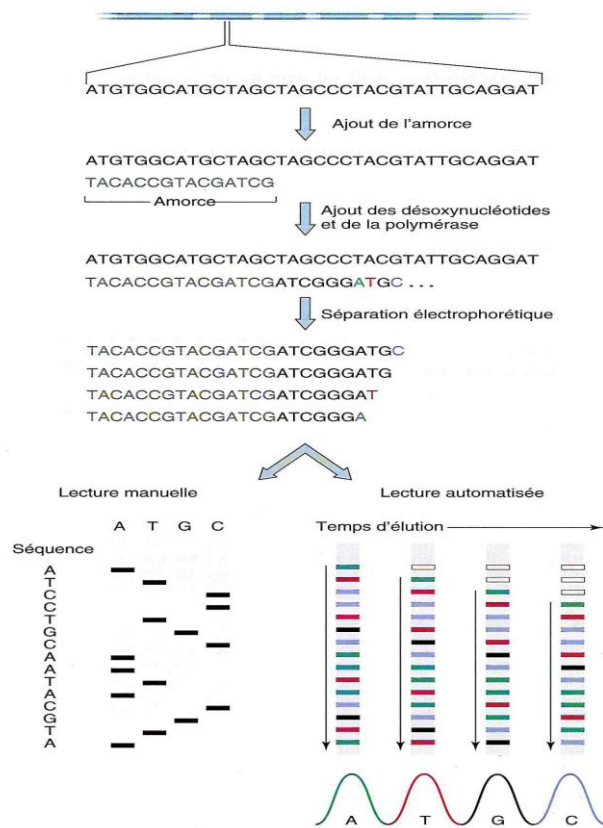


Figure 23 : Principe du séquençage utilisant des didésoynucléotides (Sanger) (Gibson et Muse, 2004).

Plusieurs avancées qui ont permis m'automatisation du séquençage selon Sanger se sont produites dans les années 1990. Les nouvelles techniques et les nouveaux équipements concernent les points suivants :

- Quatre marqueurs fluorescents ont remplacé le marquage radioactif. La fixation de ces marqueurs sur les *ddNTP* constitue une étiquette fluorescente qui marque exclusivement la molécule d'ADN qu'ils terminent, ainsi, une seule réaction de séquençage contenant les quatre *ddNTP* suffit pour séquencer n'importe quelle matrice. (Dans certaines expériences, les fluorochromes sont fixés à l'amorce de séquençage ; dans ce cas, il faut faire quatre réactions de séquençage séparés, mais on peut les regrouper en un seul dépôt pour l'électrophorèse).

- Après un certain temps, la fluorescence des produits excités par un rayon laser est détectée au moment même où ceux-ci sortent du milieu d'électrophorèse. La séquence obtenue se présente comme une série de quatre fichiers traces représentant l'intensité de

chacune des couleurs ; un pic de couleur montre que c'est la base correspondante qui a été incorporée à cette position.

- Les gels plats ont été remplacés par l'électrophorèse capillaire avec l'avènement en 1999 des séquenceurs automatisés ABI Prism™ 3700. Ces séquenceurs fournissent des lectures d'extrêmement bonne qualité sur de longues distances et économisent du temps et de l'argent en supprimant l'étape laborieuse qui consiste à couler les gels ; une nouvelle automatisation consiste à déposer les échantillons sur les capillaires avec un robot, à partir d'une plaque à 96 puits, plutôt que de le faire manuellement. Chaque machine peut travailler sur six plaques à 96 puits par jour ; cela représente 0,5Mb de séquence (Srachan et Read, 2012).

**Chapitre V.
Marqueurs génétiques**

Chapitre V. Marqueurs génétiques

V.1 RFLP (*Restriction fragment Length Polymorphism*)

Le principe repose sur la comparaison de profils de coupure par les enzymes de restriction suite à l'existence d'un polymorphisme dans la séquence d'une molécule d'ADN par rapport à une autre (p. ex. l'ADN d'un père et de son fils). Des mutations apparaissant sur une séquence d'ADN reconnue par une enzyme de restriction provoquent des longueurs de fragments de restriction différentes. L'ADN des individus à comparer est donc digéré par une ou plusieurs enzymes de restriction. Les produits de restriction sont ensuite séparés sur gel d'acrylamide ou d'agarose en présence d'un marqueur de poids moléculaire. Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction observé est utilisé comme critère d'identification. Par cette approche, deux individus pourront présenter des profils de restriction différents. De nombreuses techniques sont utilisées pour détecter un polymorphisme, comme par exemple :

L'hybridation moléculaire de type *Southern-blot* : les fragments de restriction sont hybridés avec une sonde constituée d'un fragment marqué d'ADN complémentaire d'une séquence spécifique de l'ADN (Tagu et Moussard, 2003).

Très tôt après l'application de la technique de *Southern-blot* pour l'analyse du génome, à la fin des années 70, il a été découvert que tous les individus n'ont pas exactement la même distribution des sites de restriction (Jeffrey, 1979). Bien que l'existence d'une variation au niveau nucléotidique pouvait être prédite grâce à ce que l'on connaissait au sujet des mutations et du polymorphisme des protéines. Puisque les enzymes de restriction ont dans l'ADN des séquences de reconnaissance spécifique, des changements de séquence dans l'ADN génomique dus à une mutation héritée ou à une *néomutation* peuvent conduire à la formation ou à la perte de sites de reconnaissance, ce qui va entraîner des modifications dans la taille d'un ou plusieurs fragments révélés par l'hybridation avec une sonde donnée lors d'une analyse en *Southern-blot*. Les RFLP peuvent également apparaître après délétion ou insertion d'un segment d'ADN plutôt que suite à un changement dans un nucléotide. Si un segment d'ADN situé entre deux sites de restriction était délété ou inséré, la taille du fragment de restriction serait différente (Figure 24). Puisque plusieurs centaines d'enzymes de restriction sont disponibles pour détecter une très grande variété de séquences de 4 à 9 paires de bases, cette méthode permet un examen approfondi de la séquence des nucléotides dans les régions voisines d'une sonde d'ADN. La variation dans les sites de restriction détectés de cette manière est appelée polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP,

Bostein et *al.*, 1980). Les différentes longueurs de fragments constituent des allèles codominants à un locus de l'ADN.

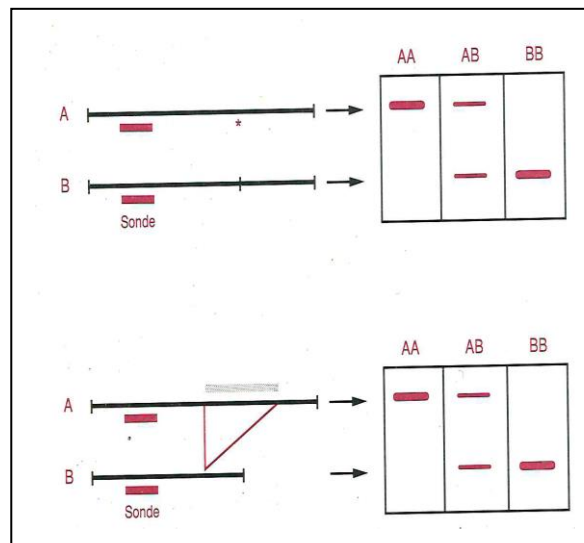


Figure 24 : Polymorphisme de la longueur des fragments de restriction (RFLP) détectés par hybridation de l'ADN (analyse de Southern) (Margaret et *al.*, 1995).

En haut de la figure, le polymorphisme est dû à une variation au niveau d'un site spécifique de clivage par une enzyme de restriction : dans l'allèle A, le site est absent (*), et le fragment de restriction détecté par la sonde est plus grand que celui de l'allèle B. En bas de la figure le polymorphisme est dû à une insertion, une délétion d'un fragment d'ADN (barre grise) à l'intérieur d'un fragment de restriction détecté par la sonde. Pour les deux types de polymorphisme, le profil d'ADN observé par l'analyse de Southern dans les trois génotypes possibles à ce locus sont indiqués.

On peut facilement examiner par analyse de Southern la longueur des différents fragments, reflétant le génotype (la séquence d'ADN) à un site de restriction particulier (Figure 25). La découverte des polymorphismes de l'ADN a souligné combien de copies d'un gène particulier sont véritablement uniques. Cependant, conceptuellement, les polymorphismes de l'ADN ne constituent pas une nouveauté ; ils représentent simplement la manifestation moléculaire de la variation du génome qui est apparue depuis les études du polymorphisme au niveau des protéines (Margaret et *al.*, 1995).

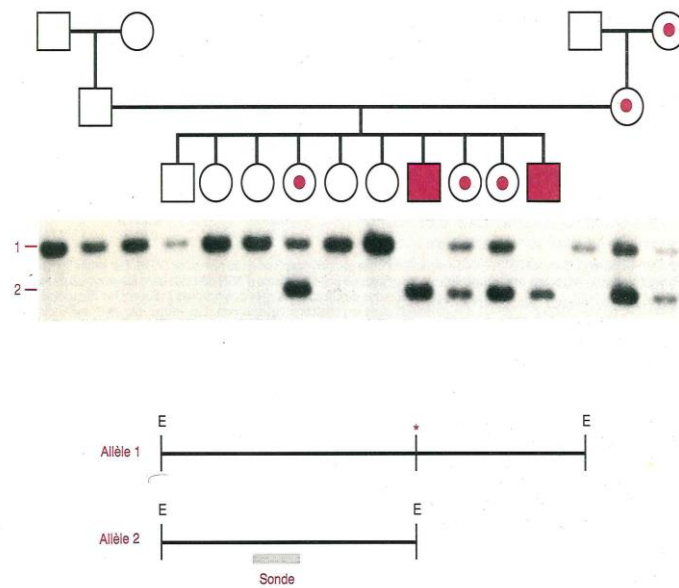


Figure 25 : Hérédité codominante d'un RFLP lié au chromosome X. Les allèles 1 et 2 diffèrent par une différence des sites de reconnaissance de l'enzyme de restriction *EcoRI* (E). Les symboles rouges indiquent l'hérédité de l'allèle 2 (Margaret et *al.*, 1995).

V.2 Minisatellites

Les minisatellites correspondent à des polymorphismes de répétition ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Ils sont extrêmement polymorphes et organisés en plus de 1000 régions (longues de 0,1 à 20 kb) de courtes répétitions en tandem (Jeffreys et *al.*, 1987) d'où leur utilisation principale pour réaliser des empreintes d'ADN spécifiques d'individu. Le nombre de répétitions varie d'un individu à l'autre et constitue un allèle, la variation modifiant simultanément et de façon homothétique la carte de restriction de plusieurs enzymes de restriction (Figure 26).

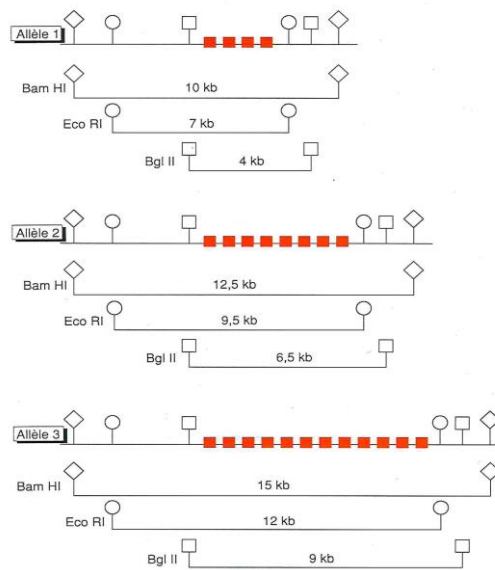


Figure 26 : Exemple théorique de carte de restriction autour d'un VNTR multiallélique (minisatellite) (Kaplan et Delpeche, 2007).

Chaque carré rouge symbolise une séquence répétée. Les variations sont homothétiques avec les différentes enzymes de restriction. Une seule enzyme suffit pour l'analyse.

Les minisatellites se trouvent plus fréquemment dans les régions subtélomériques des chromosomes (Amarger et *al.*, 1998) mais ils peuvent être présents à d'autres sites chromosomiques (Hayes, 2000) et leur variabilité semble être liée à des recombinaisons méiotiques "*crossing-over*" inégales (Jeffreys et *al.*, 1998). Les minisatellites hypervariables sont extrêmement polymorphes, leur rôle biologique n'est pas élucidé, sauf dans le cas de l'ADN télomérique dont une fonction supposée, est de protéger l'extrémité des chromosomes de la dégradation et d'en permettre la réplication (Schibler et *al.*, 2000). Ils permettent l'identification des empreintes génétiques très spécifiques de chaque individu mais ils sont surtout difficilement interprétables (Boichard et *al.*, 1998). La plupart des systèmes de typage minisatellites révèlent des bandes (allèles) de plusieurs *loci* qui sont toutes visualisées ensemble dans une voie d'un gel (Figure 27).

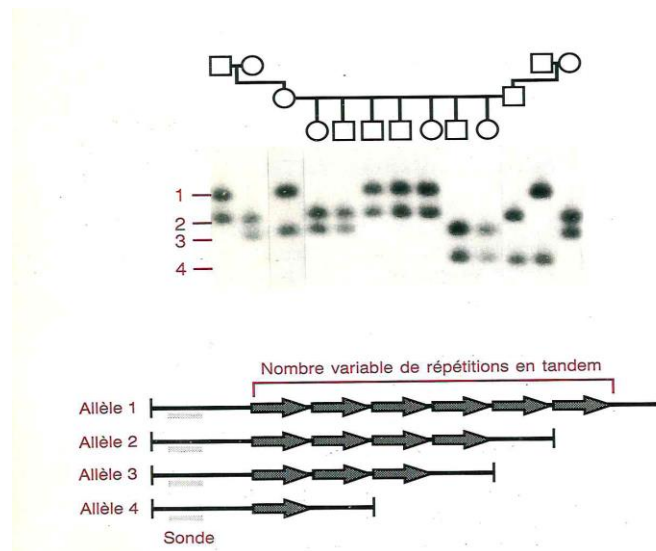


Figure 27: Hérité codominante d'un polymorphisme hypervariable autosomique de l'ADN causée par un nombre variable de répétitions en tandem (VNTR) (Margaret et *al.*,1995).

Les allèles 1 à 4 sont composés d'un nombre variables de courtes séquences d'ADN (flèches) quasi identiques. La variation de taille peut être détectée après digestion par les enzymes de restriction et hybridation avec une sonde unique qui reconnaît une séquence située en dehors des séquences VNTR elles-mêmes mais à l'intérieur des sites de restriction utilisés pour définir les fragments alléliques.

V.3 Microsatellites

Les microsatellites ou *STR* (*Short Tandem Repeats*) sont des séquences d'ADN répétées en tandem dont la séquence est simple (souvent 1 à 4 pb) et qui sont réparties dans le génome) et possédant une localisation précise dans le génome (Vaiman *et al.*, 1994), dans les introns des gènes et dans les régions non transcrites.

Les microsatellites sont des marqueurs d'ADN nucléaires, codominants, neutres (situés dans des régions non codantes en général) et donnant des résultats fiables et reproductibles (Sunnucks, 2000). Leur popularité tient à la possibilité de déterminer le génotype des individus avec un marqueur génétique très polymorphe, à un coût raisonnable (Weber et Wong, 1993). Les marqueurs de type microsatellite présentent l'intérêt d'avoir souvent un fort polymorphisme. Pour chaque marqueur, un individu possède deux allèles, un transmis par son père et un transmis par sa mère, qui déterminent son génotype. Ces courts polymorphismes de répétition en tandem peuvent être analysés rapidement en utilisant la PCR de la séquence entourant le microsatellite (Weber et May, 1989 ; Litt et Luty 1989) puis électrophorèse de l'amplifiat dans un gel de polyacrylamide dont la haute résolution permet de distinguer les allèles dont la taille diffère de deux bases seulement (Figure 28) (Boichard *et al.*, 1998). Aujourd'hui, les microsatellites sont détectés par amplification grâce à des amorces marquées par fluorophores et analysés par électrophorèse capillaire automatique (Kwok *et al.*, 1994).

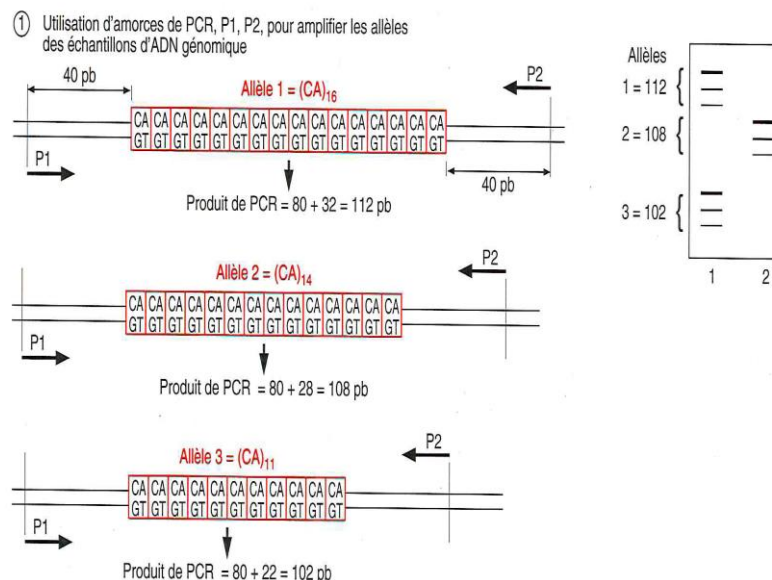


Figure 28 : La PCR peut être utilisée pour caractériser les polymorphismes de courtes répétitions en tandem (Strachan et Read, 1998).

Les microsatellites de type (CA) sont les plus fréquents et les mieux caractérisés les motifs de base rencontrés dans les microsatellites sont indiqués dans le tableau 1. Les microsatellites de type (CA)_n/(GT)_n seront seuls envisagés ici, en raison de leur intérêt particulier. En effet, ils sont remarquablement abondants (de l'ordre de 140 000 pour l'ensemble du génome humain) et uniformément distribués (contrairement aux minisatellites qui sont plus abondants dans les régions télomérique), ce qui représente un exemplaire tous les 25 à 100 kb. De plus, ils sont très polymorphes (le nombre d'allèles observés est d'autant plus grand que le microsatellite est plus long) et leur informativité est élevée. Avec un **PIC > 0,6** pour plus de 50% d'entre eux, les microsatellites sont presque aussi informatifs que les minisatellites, et beaucoup plus que les RFLP bi-alléliques.

Tableau 1 : Motifs répétés en tandem dans les microsatellites polymorphes (Kaplan et Delpech, 2007).

Longueur du motif	Séquence du motif (sur un brin)	Commentaire
1 pb	(A) _n /(T) _n	Séquence poly(A) dans les répétitions de la famille Alu
2 pb	(CA) _n /(TG) _n	Le plus abondant et le plus utilisé des microsatellites (1 tous les 25 à 100 kb de l'ADN génomique)
3 pb	(TC) _n /(GA) _n	Fréquence : 1 tous les 300 à 500 kb
	(TTA) _n /(TAA) _n	
	(AATC) _n /(GATT) _n	
	(AATG) _n /(CATT) _n	
	(ACAG) _n /(CTGT) _n	
	(AAAT) _n /(ATTT) _n	
	(AAAG) _n /(CTTT) _n	Motifs polymorphes dérivant de séquences poly(A) des répétitions de la famille Alu

Il existe aussi des motifs de 5 à 6 nt non montrés ici.

Chapitre VI.

Stratégies du diagnostic génotypique

Chapitre VI. Stratégies du diagnostic génotypique

VI.1 Analyse directe

a) Délétion minimale : mutation ponctuelle

L'hémoglobine de l'anémie falciforme (HbS) a été l'une des premières hémoglobines anormales été détectée et elle est de très grande importance clinique. Elle est due à un changement dans seulement un acide aminé sur 146 de la β -globine : une substitution de l'acide glutamique par une valine au niveau de la sixième position du polypeptide. Cette mutation ponctuelle, qui peut être résumée par l'abréviation β 6 Glu \rightarrow Val (une méthode rapide pour résumer les mutations), résulte en un changement d'un seul nucléotide (A \rightarrow T) au niveau du codon (Figure 29). **A.** La séquence des nucléotides du codon 6 à 8 de la β -globine et les acides aminés correspondants sont illustrés. La séquence reconnue par *MstII* est également illustrée pour comparaison. Seul le gène β^A est coupé à ce niveau. **B.** Les sites de clivage de *MstII* (flèche) dans la région 5' du gène de la β -globine et les différents fragments obtenus dans les gènes β^A et β^S . **C.** Représentation d'un Southern-blot montrant les fragments d'ADN observés après clivage par *MstII* de l'ADN de personnes normales (génotype A/A), de personnes porteuses du trait de l'anémie falciforme (génotype A/S), et de personnes atteintes d'anémie falciforme (génotype S/S) et révélés au moyen d'un ADNc de la β -globine.

Cette mutation à l'état homozygote est la cause de l'anémie falciforme, une maladie sévère, qui dans certaines parties du monde est relativement fréquente. La maladie a une distribution géographique caractéristique, survenant plus fréquemment en Afrique équatoriale et moins fréquemment dans la région méditerranéenne, en Inde ainsi que dans les pays où les gens originaires ont migré. Environ un noir sur 600 naît avec cette maladie qui est souvent fatale au cours du début de l'enfance, bien qu'une survie plus longue soit de plus en plus fréquente (Margaret et *al.*, 1995).

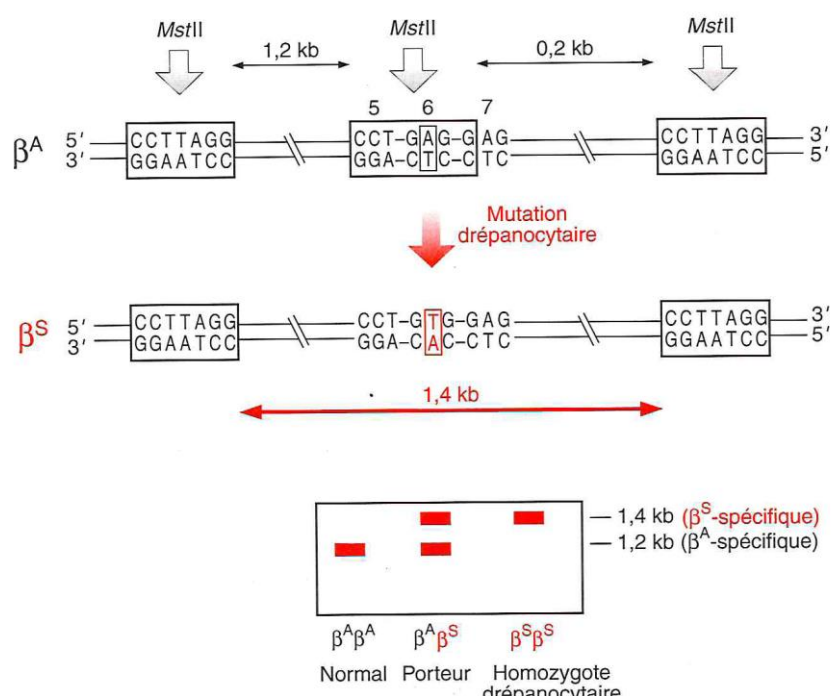


Figure 29 : Utilisation de l'enzyme de restriction *MstII* dans le diagnostic de l'anémie falciforme (Strachan et Read, 1998).

2.3 Hybridation d'oligonucléotides spécifique d'allèles (ASO : *Allele-Specific Oligoprobe*)

La construction de sondes **d'oligonucléotides spécifique d'allèles (ASO, pour *allele-specific oligonucleotides*)** à partir de séquences incluant un site nucléotidique variant est une méthode classique pour distinguer des allèles qui ne diffèrent que par une simple substitution d'un nucléotide. Les sondes ASO ont typiquement une longueur de 15 à 20 nucléotides et sont normalement utilisées dans des conditions d'hybridation où le duplex d'ADN entre la sonde et la cible sont stables uniquement s'il existe entre elles une complémentarité de bases parfaite : un simple mésappariement entre la sonde et la cible suffit à rendre ce court duplex instable (Figure 30). Ces oligonucléotides sont donc typiquement conçus pour que la différence d'un nucléotide unique entre les allèles soit située dans un segment central de l'oligonucléotide, afin que l'instabilité thermodynamique du duplex mésapparié soit maximale.

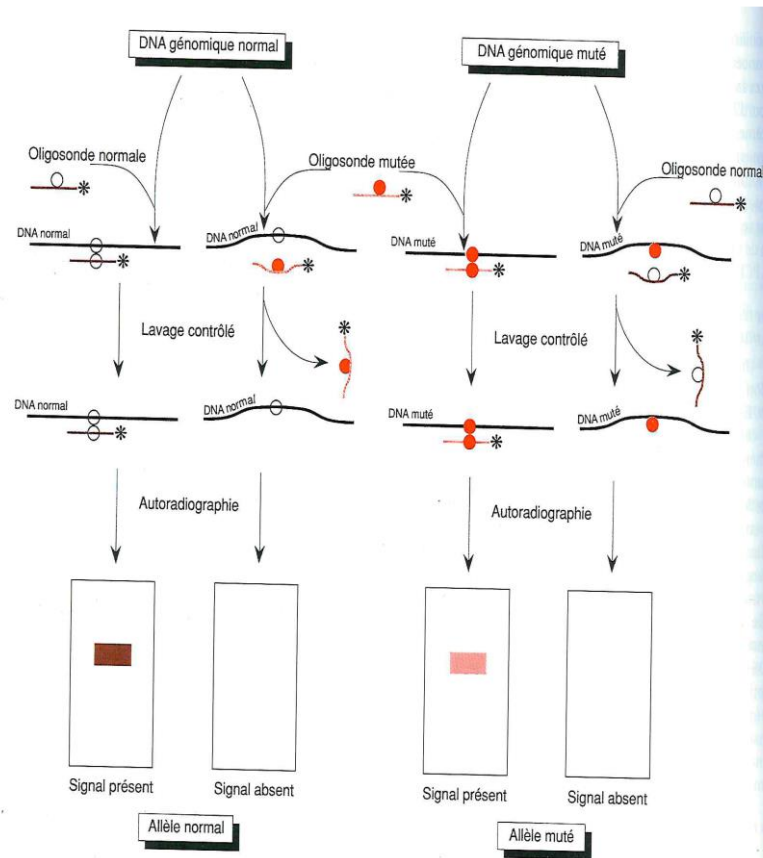


Figure 30 : Principe de la détection d'une mutation ponctuelle par oligosonde de synthèse (Kaplan et Delpêche, 2007).

Ces oligonucléotides étaient autrefois marqués avec un isotope radioactif (^{32}P), ils le sont maintenant avec un marqueur froid. Ils sont hybridés avec un produit d'amplification par PCR de la région à étudier, obtenu à partir de l'ADN du sujet à analyser, dans des conditions de milieu et de température où seuls les appariements parfaits sont autorisés. Les hybrides sont analysés par dot-blot, ou par tout autre système de visualisation des hybrides. Si l'ADN du sujet est muté, il doit s'hybrider avec l'oligonucléotide sous sa version mutée, mais pas avec l'oligonucléotide version normale. Un résultat inverse est obtenu avec de l'ADN témoin d'un sujet normal. Un signal positif sera obtenu avec les deux sondes chez un hétérozygote.

Cette méthode présente l'inconvénient de nécessiter au moins quatre oligosondes (deux amorces pour l'amplification et deux oligosondes pour l'hybridation) et d'être très sensible aux conditions d'hybridation et de lavage, des témoins doivent donc obligatoirement être

étudiés. Des exemples de séquences d'oligonodes utilisés pour le diagnostic et quelques mutations sont données dans le tableau 2 (Kaplan et Delpeche, 2007).

Tableau 2 : Exemples d'oligonucléotides de synthèse allèle-spécifique pour le diagnostic de mutations ponctuelles (Kaplan et Delpeche, 2007).

Sonde pour la mutation HbS (codon 6, β globine)	N : CTCCTGAGGAGAAGTCTGC M : CTCCTGTGGAGAAGTCTGC
Sonde pour la mutation HbC (codon 6, β globine)	N : CTCCTGAGGAGAAGTCTGC M : CTCCTAGAGGAGAAGTCTGC
Sonde pour la mutation Hb ^{39STOP} (Thalassémie)	N : CCTTGGACCCAGAGGTTCT M : CCTTGGACCTAGAGGTTCT
Sonde pour la mutation PI ^z (α 1- antitrypsine Codon 342)	N : ACCATCGACGAGAAAGGAC M : ACCATCGACAAGAAAGGAC
Sonde pour la mutation PAH ^{ivS12} (phénylcétonurie)	N : TCCATTAACAGTAAGTAATTT M : TCCATTAACAATAAGTAATTT

On hybride séparément la cible avec la version normale (N) et la version mutée (M). Un signal positif (N+ ou M+) signifie que l'allèle correspondant est présent. Les trois situations suivantes peuvent exister :

- N+ et M- : génotype homozygotes N/N ;
- M+ et N- : génotype homozygote M/M ;
- M+ et N+ : génotype hétérozygote M/N.

De telles techniques de discrimination peuvent être utilisées employées pour de nombreuses applications de recherche ou de diagnostic. Ces sondes ASO peuvent être utilisées en Southern-blot conventionnel et surtout, beaucoup plus simplement, en dot-blot (Strachan et Read, 1998). La mutation drépanocytaire est une substitution d'un seul nucléotide (A \rightarrow T) au niveau du codon 6 du gène β -globine, résultant en une substitution GAG (Glu) \rightarrow GTG (Val). Cet exemple montre comment l'on peut construire des ASO : l'un spécifique de l'allèle normal (β^A) et identique à la séquence de 19 nucléotides recouvrant les codons 3-9 de cet allèle ; l'autre spécifique de l'allèle muté (β^S) et identique à la séquence

équivalente de l'allèle muté. Les ASO marqués peuvent être hybridés individuellement à l'échantillon d'ADN génomique dénaturé sur dot-blot (Figure 31). Les ASO spécifiques β^A et β^S peuvent s'hybrider respectivement aux brins antisens complémentaires des allèles normaux et mutés, formant des duplex parfaits de 19 pb. Cependant les duplex entre l'ASO spécifique β^A et l'allèle β^S , ou entre l'ASO spécifique β^S et l'allèle β^A ont un seul mésappariement et sont instables lorsqu'ils sont hybridés à forte stringence.

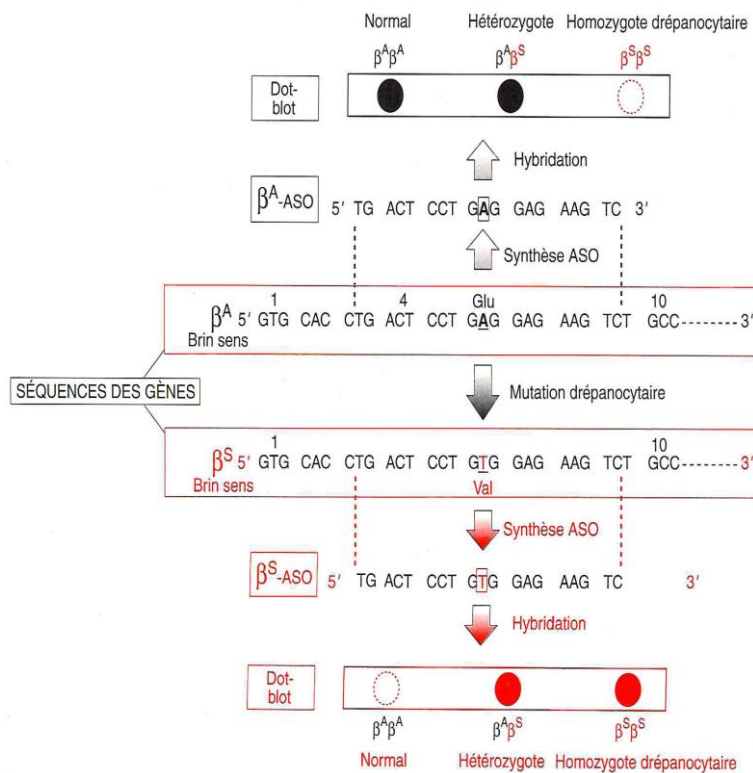


Figure 31 : Hybridation en dot-blot avec des oligonucléotides d'allèles (ASO) permet d'identifier des individus présentant une mutation drépanocytaire (Strachan et Read, 1998).

VI.2 Analyse indirecte

Lorsque dans une famille donnée, on a identifié des marqueurs associés à une infection, il est théoriquement possible d'utiliser ces marqueurs pour déterminer qui est porteur ou non de l'affection sans chercher à en identifier la ou les mutations : on parle de génotypage (ou de diagnostic) indirect. Un exemple est donné dans à la figure 32 : dans cette famille ségrège une maladie récessive liée à l'X pour laquelle un marqueur génétique polymorphe proche du locus de la maladie a été génotypé. L'allèle 1 du marqueur est porté par l'X qui héberge la mutation. La femme III-2, qui a hérité de l'allèle 3 de sa mère, a très peu de risque d'être conductrice. Ce risque n'est toutefois pas totalement nul : il dépend en effet de la probabilité de recombinaison entre le marqueur et le gène morbide à la méiose chez sa mère II-2. Il est important de se rappeler que dans les études indirectes, on ne peut pas inférer le génotype au locus morbide à partir du génotype du marqueur : l'allèle du marqueur lié au gène muté est un variant polymorphe non pathogène dont l'association avec une mutation est purement fortuite. Ainsi III-2, qui n'est pas conductrice, a le même génotype que sa mère II-2, qui porte la mutation. Le fœtus, qui a le même génotype 2-1 que son grand-parent malade, a un faible risque d'être porteur. Pour savoir quel haplotype du marqueur suit la mutation pathogène, il faut obligatoirement se référer à la ségrégation de ce marqueur dans la famille étudiée (Donnai et Read, 2009).

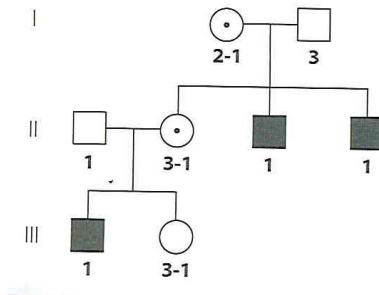


Figure 32 : Un exemple de diagnostic indirect (Donnai et Read, 2009).

Le marqueur étudié étant sur l'X, les hommes n'ont qu'un seul (exemplaire de ce marqueur) allèle.

Diagnostic par association allélique

Dans certains cas, rares mais privilégiés, cette association est significative par ce qu'il existe un déséquilibre de liaison entre la mutation et l'allèle en question. Dès lors l'association entre allèle morbide et allèle du marqueur représente une constante propre à la maladie à étudier dans une population donnée. Cette méthode n'est applicable qu'aux maladies génétiques résultant d'un effet fondateur, c'est-à-dire d'une mutation unique conférant un avantage sélectif pour atteindre un niveau détectable dans une population donnée. Peu de maladies génétiques obéissent à ces critères, et rares sont les exemples où le diagnostic peut être fondé sur la présence d'un allèle de polymorphisme spécifique. Ce fut le cas de l'exemple historique de la drépanocytose (Figure 33). Il s'agit du RFLP bi-allélique *HpaI* (7,6 kb/13 kb) situé quelques kilobases en aval du gène de la β -globine, où l'allèle 13 kb a été retrouvé associé à la mutation β^S de la drépanocytose chez les Noirs américains (Kan et Dozy, 1978). Comme il existe aussi des individus portant le gène β^A dans un contexte *HpaI*/13 kb, il est probable que la divergence 7,6 kb \rightarrow 13 kb a précédé l'apparition de la mutation β^S . Celle-ci est survenue sur un chromosome 13 kb et s'est ensuite répandue en association avec l'allèle 13 kb. Cette association allélique a été mise à profit pour le premier diagnostic prénatal effectué par analyse de RFLP. Il est très vite apparu que la mutation β^S n'est pas associée dans tous les cas à l'allèle 13 kb :

- Soit par suite de recombinaison dans la descendance d'un fondateur unique,
- Soit parce que la mutation β^S est apparue indépendamment chez plusieurs fondateurs dans des territoires géographiquement éloignés. C'est cette dernière hypothèse qui s'est avérée exacte. Grâce à l'étude des haplotypes de la région du gène de la β -globine, on a pu démontrer l'existence d'au moins cinq foyers géographiques indépendants où la mutation β^S a pris naissance. Dans chaque foyer celle-ci s'est répandue grâce à l'avantage sélectif vis-à-vis du paludisme que confère l'hétérozygotie $\beta^A\beta^S$ (Kaplan et Delpech, 2007).

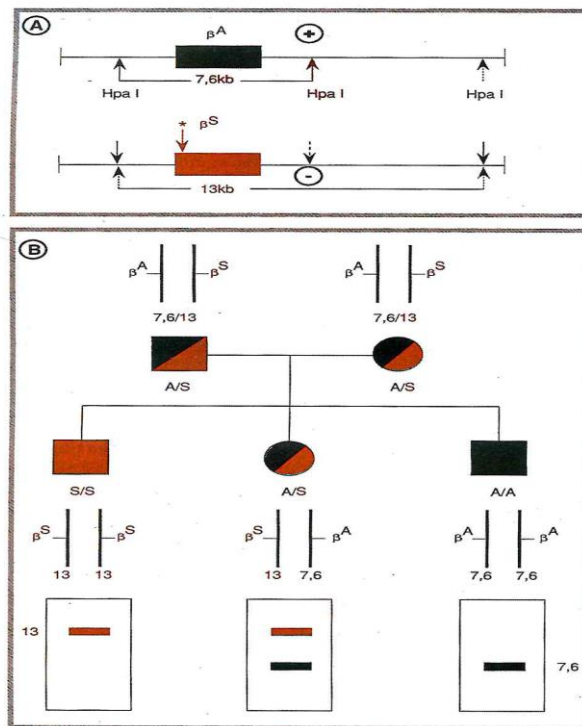


Figure 33 : Diagnostic prénatal indirect pour un allèle de restriction associé à une mutation : l'exemple historique de la drépanocytose (Kaplan et Delpech, 2007).

Diagnostic indirect par analyse de polymorphismes sans association allélique préférentielle

Il consiste à se fier à un ou plusieurs polymorphismes intra- ou juxtagéniques, sans recherche d'un allèle ou d'un haplotype particulier. Il faut donc procéder à une analyse génotypique complète **dans chaque famille** pour déterminer lequel des allèles de chaque site polymorphe est couplé à la mutation.

Le diagnostic indirect est d'une difficulté variable selon le mode de transmission de la maladie et selon le type de marqueur utilisable (Kaplan et Delpeche, 2007).

Inconvénients du diagnostic génotypique indirect

- *L'insuffisance d'informativité* peut poser un problème difficile pour les pathologies récessives si la famille est petite et qu'un membre clé fait défaut pour résoudre une phase. Elle est également tributaire du type de marqueur utilisé.

- La recombinaison est un problème majeur car elle peut conduire à un diagnostic erroné si elle passe inaperçue. Elle peut être détectée grâce à l'utilisation d'un second marqueur situé de l'autre côté de la lésion (Figure 34).

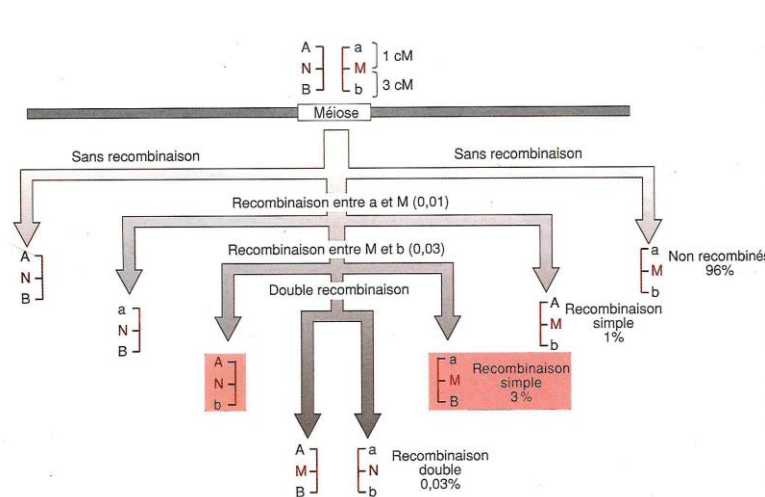


Figure 34 : Diagnostic par génotypage montrant une recombinaison (Kaplan et Delpech, 2007).

En utilisant 2 marqueurs flanquant la lésion génétique, les recombinaisons simples peuvent être détectées. Seule une double recombinaison dont le risque est faible, passerait inaperçue.

Comme l'indique la cette figure, une recombinaison simple par crossing-over unique entre la lésion génique et le site du marqueur passe inaperçue si on n'explore que ce seul site. Le risque d'erreur est égal au risque de recombinaison à ce niveau, c'est-à-dire en théorie 1% par centimorgan. Si l'on explore deux marqueurs situés de part et d'autre de la lésion, on visualise le changement de phase produit par une recombinaison simple, que celle-ci se soit produite d'un côté ou de l'autre de la lésion. Seule passerait une double recombinaison qui maintiendrait le couplage entre les allèles polymorphes tout en changeant la phase par rapport au gène muté.

- L'hétérogénéité génétique est un facteur essentiel à considérer lorsqu'on l'on désire procéder au diagnostic génotypique indirect. Lorsque l'on hésite entre plusieurs gènes possibles dont on doit explorer la pathologie, on pourrait en théorie procéder à une **mini-analyse de linkage** visant à réduire par élimination le nombre de gènes à analyser. La procédure n'est envisageable que si la famille comporte un nombre suffisant de méioses informatives (Kaplan et Delpech, 2007).

VI. Applications du diagnostic génotypique

Les examens de génétique moléculaire, souvent qualifiés de tests génétiques, ont de nombreuses applications médicales :

1. Amniocentèse

Elle est faite habituellement entre 14 et 20 semaines de grossesse (Figure 35), mais elle peut être réalisée, en cas de besoin (diagnostic échographique tardif) jusqu'au 8^{ème} mois de grossesse. Le liquide amniotique est composé principalement d'urine fœtale et de liquide excrété par les poumons. De nombreux tests peuvent être réalisés sur le liquide. Les cellules fœtales qu'il contient peuvent être cultivées pour des analyses cytogénétique ou de biologie moléculaire. Les cellules amniotiques qu'il contient doivent être cultivées deux semaines environ avant d'obtenir des préparations chromosomiques de bonne qualité. Le liquide amniotique constitue une source plus réduite d'ADN que les villosités chorales parce qu'il contient peu de cellules. L'amniocentèse comporte un risque de 0,5 à 1 % de fausse couche (Donnai et Read, 2009).

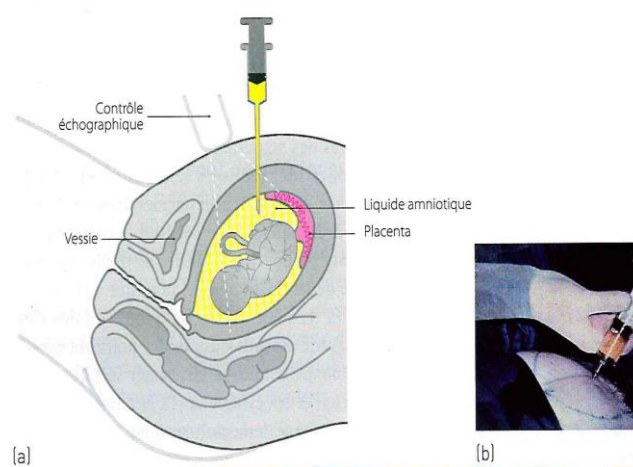


Figure 35 : Amniocentèse. (a) Principe du prélèvement. (b) Aspiration de liquide amniotique. (Donnai et Read, 2009).

La biopsie de trophoblaste est effectuée par aspiration du tissu trophoblastique du fœtus (villosités chorales) soit par voie transcervicale, soit par voie transabdominale. Dans la mesure où cette procédure est généralement effectuée pendant la grossesse entre 10 et 11 semaines d'aménorrhée, la biopsie de trophoblaste présente l'avantage de fournir un

diagnostic plus précoce que l'amniocentèse, qui est pratiquée au cours du deuxième trimestre (Jorde et *al.*, 2003). Cette méthode permet d'obtenir un diagnostic chromosomique, cytogénétique ou biochimique. Le prélèvement de villosités chorales s'effectue en ambulatoire chez une patiente non à jeun et après réalisation d'une échographie permettant de vérifier le terme, la vitalité embryonnaire et de localiser le trophoblaste et son accessibilité pour le prélèvement (Sentilhes et *al.*, 2011).

2. Dépistage des hétérozygotes

➤ Les maladies génétiques susceptibles de faire l'objet d'un dépistage des hétérozygotes sont généralement des pathologies à transmission autosomique récessive, pour lesquelles un diagnostic prénatal et un conseil génétique sont disponibles, applicables et précis. La β -thalassémie majeure, une maladie grave à transmission autosomique récessive, est particulièrement fréquente dans de nombreuses populations du pourtour méditerranéen et d'Asie du Sud. Des programmes efficaces de dépistage des porteurs ont permis de réduire de 75% la prévalence de nouveau-nés souffrant de cette maladie en Grèce, à Chypre et en Italie (Jorde et *al.*, 2004).

➤ Les individus qui présentent des risques de développer une maladie peuvent être testés afin de déterminer s'ils ont reçu une mutation pathogène avant que n'apparaissent des symptômes cliniques de cette pathologie exemple la chorée de Huntington, la polykystose rénale, l'hémochromatose et le cancer du sein à transmission autosomique dominante. En informant les individus qu'ils portent ou non une mutation pathogène, le diagnostic présymptomatique contribue à une prise de décision raisonnée en matière de procréation ou dans le cas du cancer de sein, les individus peuvent subir plus jeunes une mammographie afin d'améliorer les chances de détection précoce des tumeurs (Jorde et *al.*, 2004).

4- Détection des néomutations

➤ Pas de risque d'apparition de la maladie que pour la descendance du cas index.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Amarger V., Gauguier D., Yerle M., Apiou F., Pinton P., Giraudeau F., Monfouilloux S., Lathrop M., Dutrillaux B. et Buard J. (1998). Analysis of Distribution in the Human, Pig, and Rat genomes Points toward a General Subtelomeric Origin of Minisatellite Structures. *Genomics*, **52** : 62-71.
- Boichard D., Le Roy P., Levéziel H. et Elsen J.M. (1998). Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. *INRA Productions Animales*, **11** : 67-80.
- Boitard C. (2000). Hypertension artérielle, stéroïdes et grossesse. *Médecine thérapeutique*, **6** (7).
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. et Davis R.W. (1985). Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am J Hum Genet.*, **32** : 314-331.
- Bray A., Johnson H., Raff R. et Walter R. (2012). L'essentiel de la biologie cellulaire. Edition *Lavoisier, Médecine Sciences*, Paris, pp 18.
- Bris C., Desquirit-Dumas V., Gueguen N., Amati-Bonneau P., Reynier P. et Proccacion V. Pathologies liées à des mutations de l'ADN. *Elsevier*, Vol, Issue 505 : 71-80.
- Byers PH. (1989). Inherited disorders of collagen gene structure and expression. *Am J Med Genet.*, **34**(1) : 72-80.
- Byers PH. (1990). Brittle bones--fragile molecules: disorders of collagen gene structure and expression. *Trends Genet.*, **6**(9) : 293-300
- Cao A., Galanello R. et Rosatelli M.C. (1995). Pathologie moléculaire et diagnostic de la β -thalassémie intermédiaire. *Hématologie*, **1** : 289-94.
- Costain G., Cohn R.D, Scherer S.W., et Marshall C.R. (2022). Séquençage du génome comme test diagnostique. *CMAJ*. **194**(5) : E174–E178.
- Donnai D. et Read A. (2009). Génétique médicale. De la biologie à la pratique clinique. 1^{ère} Edition *De Boeck*, Bruxelles. 460 p.
- Good J.M., Burgunder J.M. et Wider C. (2015). Maladie de Huntington. Du gène à la clinique. *Swiss Medical Forum*, **15**(44) : 1022–1026.
- Griffiths A., Gelbart W.T., Miller J.H et Lewontin R. (2001). Analyse génétique moderne. 1^{ère} Edition *De Boeck*, Paris. 676 p.
- Hayes H. (2000). Notions de base de génétique : ADN et chromosomes. *INRA Prod. Anim., hors-série*, 13-20.

- Jean-Pierre M., Jonveau P., Lacombe D., Leporrier N., Lyonnet S et Moraine C. (2004). Génétique Médicale : Formelle, chromosomique, moléculaire, clinique. *Edition Masson*, Paris. 412 p.
- Jeffreys A.J. (1979). DNA sequence variants in the G gamma-, A gamma-, delta-and beta-globin genes of man. *Cell*, 18 : 1-10.
- Jeffreys A.J. (1987). Highly variable minisatellites and DNA fingerprints. *Biochem Soc Trans*, 15 : 309-317.
- Jeffreys A.J., Murray J. et Neumann R. (1998). High-Resolution Mapping of Crossovers in Human Sperm Defines a Minisatellite-Associated Recombination Hotspot. *Molecular Cell*, 2 : 267-273.
- Jeunemaitre X. et Gimenez-Roqueplo A.P. (2002). Génétique et hypertension artérielle: Trois approches pour décrypter une maladie complexe. *Bulletin de L'Académie Nationale de Médecine*, 186 : 1595-1609.
- Jorde L.B., Carey J.C., Bamshad M.J. et White R.L. (2004). Génétique médicale. *Edition Elsevier*. Barcelone. Espagne. 430 p.
- Kan Y.W et Dozy A.M. (1978). Antenatal diagnosis of sickle-cell anemia by DNA analysis of amniotic-fluid cells. *Lancet*, 2 : 910-912.
- Kaplan J.C et Delpuch M. (2007). Biologie moléculaire et médecine. *Edition Flammarion-médecine*, 813p.
- Kwok P.Y. et Chen X. (2003). Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 5 : 43-60.
- Litt M. et Luty J.A. (1989). A Hypervariable Microsatellite Revealed by In Vitro Amplification of a Dinucleotide Repeat within the Cardiac Muscle Actin Gene. *Am. J. Hum. Genet.*, 44 : 397-401.
- Margaret W.T., Roderick R.M et Huntington F.W. (1995). Génétique médicale. 5^{ème} édition *Médecine-Sciences Flammarion*. 495 p.
- McGrath J. et Solter D. (1984). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, 37:179-83.
- Migeon B.R. (1994). X-chromosome inactivation: molecular mechanisms and genetic consequences. *Trends Genet*, 10 : 230-235.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R. K., Horn G. et Erlich H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 51 : 263-273.

- Pasternak J.J. (2003). Génétique moléculaire humaine. Une introduction aux mécanismes des maladies héréditaires. *1^{ère} Edition De Boeck*. Paris, 500 p.
- Pàldi A. (2006). Empreinte génomique. Métabolismes. *Hormones Diabètes et Nutrition (X)*, 1 : 6-9.
- Pennisi A. Barcia G. Steffann J. Rötig A. et Schiff M. (2022). Les maladies mitochondriales de l'enfant. *Elsevier*, 5 : 21-27.
- Rabinet C. (1992). L'empreinte génomique parental. *Médecine/sciences*, 8 : 65-70.
- Schibler L., Vaiman D. et Crihiu E.P. (2000). Origine du polymorphisme de l'ADN. *INRA Prod. Anim., hors-série*, 37-43.
- Sentilhes L., Bonneau D. Et Descamps P. (2011). Le diagnostic prénatal en pratique. *Elsevier Masson SAS*, France, 484 p.
- Serre J.L et coll. (2002). Les Diagnostics Génétiques. Edition *Dunod*, Paris, 303 p.
- Simon M.P., Maire G. et Pedeutour F. (2001). PDGFB (platelet-derived growth factor beta polypeptide (simian sarcoma viral (v-sis) oncogene homolog. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*, 5(2).
- Stoppa-Lyonnet et D. et Lenoir G. (2005). Prédispositions génétiques aux cancers : Actualités et perspectives en 2005. *Med Sci.*, 11 : 962 - 968
- Strachan T et Read A.P. (1998). Génétique Moléculaire Humaine. *Edition Flammarion-Médecine-Sciences*. 596 p.
- Strachan T et Read A. (2012). Génétique Moléculaire Humaine. 4^{ème} Edition *Lavoisier SAS-Médecine-Sciences*. 781 p.
- Sunnucks P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology&Evolution*, 15 : 199-203
- Tagu D. et Moussard C. (2003). Principes des techniques de biologie moléculaire. 2^{ème} édition *INRA*, Paris. 176 p.
- Tonin Y. et Entelis N. (2014). Pathologies de l'ADN mitochondrial et stratégies thérapeutiques. *Médecine Sciences*, 30 : 1101–1109.
- Tuffery-Giraud S. Chambert S., Demaille J. et Claustres M. (1999). Le diagnostic génotypique des myopathies de Duchenne et de Becker. *Annales de Biologie Clinique*, 57 : 417-26.
- Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lépingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S.L., Martin P., Leveziel H. et Guérin, G. (1994). A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. *Mammalian Genome*, 5 : 288-297.

- Velho G., Bellanné-Chantelot C. et Timsit J. (2003). Le MODY : modèle d'étude d'interactions génotype/phénotype dans le diabète de type 2. *Med Sci.*, 19 : 8-9.
- Weber J.L. et May P.E. (1989). Abundant Class of Human DNA Polymorphisms Which Can Be Typed Using the Polymerase Chain Reaction. *Am. J. Hum. Genet.*, 44 : 388-396.
- Weber J.L et Wong C. (1993). Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics*, 2:1123-1128.